

ARGINASE 1 MODULA POSITIVAMENTE O DESENVOLVIMENTO DE
Toxoplasma gondii EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ATIVADOS NO
PERFIL M2

LÍCIA DA SILVA PAULA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
Campos dos Goytacazes – RJ – Brasil
Fevereiro/2024

ARGINASE 1 MODULA POSITIVAMENTE O DESENVOLVIMENTO DE *Toxoplasma gondii* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ATIVADOS NO PERFIL M2

LÍCIA DA SILVA PAULA

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

Orientador:
Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
Campos dos Goytacazes – RJ – Brasil
Fevereiro/2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P324

Paula, Licia da Silva.

Arginase 1 modula positivamente o desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em macrófagos RAW 264.7 ativados no perfil M2 / Licia da Silva Paula. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

47 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Renato Augusto Damatta.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Arginase 1. 3. Macrófagos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO


Lícia da Silva Paula

ARGINASE 1 MODULA POSITIVAMENTE O DESENVOLVIMENTO DE *Toxoplasma gondii* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ATIVADOS NO PERFIL M2

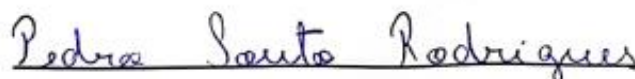
Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024

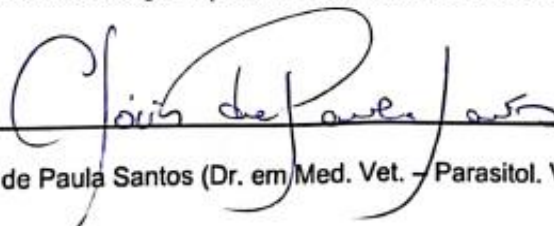
Comissão examinadora:

 Documento assinado digitalmente
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES
Data: 10/05/2024 09:18:27-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

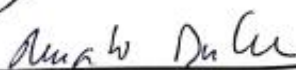
Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (Dr. em Produção Animal) – UFES



Prof. Pedro Souto Rodrigues (Dr. em Biotecnologia) – UENF



Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. em Med. Vet. – Parasitol. Veter.) – UENF



Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciências) – UENF

(Orientador)

“Consagre ao SENHOR tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos”

Provérbios 16.3

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e saúde para superar todos os momentos difíceis que enfrentei, nessa correria de adiantar o mestrado em 6 meses.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe que me deu forças e suporte em todas as ocasiões. Ao meu pai que esteve presente, me deu toda assistência e apoio para prosseguir. A minha irmã e ao meu sobrinho, por estarem sempre presentes e me acalmar nos momentos de desespero ao longo da minha caminhada.

Aos meus demais amigos de fora da UENF, por todo o suporte e apoio emocional. Em especial, Roberta Bessa da Silva, Bianca da Silva Alves, Gustavo Victor Louvain, Victória Reis Jacomini, Gabrielle Marie de Azevedo Pereira Freitas de Andrade, Diego Pádua de Almeida e Emanuel de Souza Braga.

Aos meus amigos, colegas de laboratório e ao meu grupo de pesquisa pelo apoio e constante ajuda. Em especial, Pedro Souto Rodrigues, Felipe Figueirôa Moreira e Marcos Roberto Dias Campos por todos os ensinamentos e auxílios nos experimentos.

Aos meus colaboradores Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra, Prof. Dr^a Sheila Espírito Santo Araújo e a Tâmara Carolina Gomes Ribeiro, que foram imprescindíveis ao longo de todo meu trabalho, me incentivando profissionalmente e pessoalmente a prosseguir. Em especial, a Ana Beatriz Miranda de Sá que além da constante amizade, me ensinou imensamente na pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta, pelo constante ensinamento, paciência, dedicação e confiança. Muito obrigada por todo o auxílio em todas as etapas.

Aos professores, técnicos, alunos que direta ou indiretamente me deram suporte nessa caminhada.

À UENF, LBCT, FAPERJ, CNPq e CAPES pela assistência para o desenvolvimento da pesquisa. Sobretudo à CAPES, pelo apoio e a bolsa de mestrado concedida – Código de financiamento 001.

SUMÁRIO	
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Toxoplasmose	2
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.3. Macrófagos	8
2.4. Arginase 1	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral	13
3.2. Objetivo Específico	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Cultura e ativação macrófagos RAW 264.7	13
4.2. Obtenção de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
4.3. Infecção dos macrófagos perfil M0 e M2	14
4.4. Morfologia dos macrófagos	14
4.5. Atividade de ARG1	14
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	15
4.7. Expressão e Localização de ARG1	16
4.7.1. <i>Western Blotting</i>	16
4.7.2. Imunofluorescência	17
4.8. Análise Estatística	17
5. RESULTADOS	17
5.1. Atividade de ARG1 com diferentes concentrações de ativadores	17
5.2. Microscopia óptica de campo claro	18
5.3. Avaliação do crescimento de <i>Toxoplasma gondii</i> em macrófagos RAW 264.7 M0 e M2	20
5.4. Avaliação Ultraestrutural (MET)	23
5.5. Avaliação da expressão de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 M0 e M2	25
5.6. Avaliação da localização de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 M0 e M2	25
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG1: Arginase 1

BrAMPc: 8-Bromoadenosina 3'-5'-monofosfatada cíclica

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

GAPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase

GRA: Proteínas dos grânulos densos

IFN- γ : Interferon-gamma

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

IRGs: GTPases relacionadas com a imunidade

LPS: Lipopolissacarídeo

MIC: Proteínas das micronemas

MØs: Macrófagos

NO: Óxido Nítrico

Nor-NOHA: *Ng-hydroxy-Nor-L-Arginine*

ODC: Ornitina descarboxilase

PVM: Membrana do vacúolo parasitóforo

RONs: Proteínas do pescoço das róptrias

ROP: Proteínas Róptrias

SFB: Soro fetal bovino

STAT: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição

TGF- β : Fator de transformação do crescimento

TLRs: Toll-like receptors

TNF: Fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral

VP: Vacúolo parasitóforo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii* e suas organelas. De Souza e colaboradores, 2010.

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Processo de replicação dos merozoítos dentro dos enterócitos do gato (fase sexuada) e liberação dos oocistos não esporulados pelas fezes felídeos (1); Fusão dos gametas e a formação dos oocistos esporulados no ambiente (2); A fase assexuada se sucede nos hospedeiros intermediários e definitivos através contaminação de oocistos esporulados no ambiente e conversão em taquizoítos (3); os taquizoítos se convertem em bradizoítos formando cistos (4); a contaminação de água e alimentos pelos oocistos esporulados no ambiente ou pela ingestão de cistos teciduais e transmissão horizontal para os seres humanos (5); transmissão vertical através da placenta da mãe contaminada para o feto (6). Traduzido de Hunter & Sibley (2012).

Figura 3. Representação dos perfis de ativação de macrófagos M1 e M2 e suas funções metabólicas. Estímulos M1: LPS (lipopolissacarídeo); TNF α (Fator de necrose tumoral alfa); IFN γ (Interferon-gama). Fatores de regulação de transcrição M1: (IRF / STAT) (IRF3, IRF5, STAT1 e STAT5); heterodímero do fator nuclear ativo kappa B (NF κ B) (p50-p65); HIF1; miR127, miR155 e miR223. Citocinas liberadas em macrófagos M1: (TNF α IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, IFN γ); Quimiocinas: (CXCL10); iNOS (óxido nítrico sintase); NO (óxido nítrico); HLA-DR (Receptor de superfície celular de antígeno leucocitário humano). Estímulos M2: IL-4; IL-13; IL-10; TGF β (fator de crescimento transformador β). Fatores de regulação de transcrição M2: (IRF/STAT) (IRF4, STAT 3 e STAT6); homodímero inibitório NF κ B (p50-p50); HIF2. miR146a. Citocinas liberadas em macrófagos M1: (IL-10); Quimiocinas: (CCL5, CCL17, CCL18, CCL22); outras proteínas (CD163, CD206, ARG1, MMP-9, Fizz-1, Ym-1 e PD-L1). Traduzido de Genard e colaboradores (2017).

Figura 4. Estrutura química da arginase 1. Ash (2004).

Figura 5. Metabolismo da arginina e interação entre enzima óxido nítrico sintase induzida e arginase 1, na infecção por *Toxoplasma gondii*. NO (óxido nítrico); iNOS (óxido nítrico sintase); Nor-NOHA (inibidor de arginase); OAT (ornitina amino transferase); ODC (ornitina) descarboxilase); Spd Syn (espermidina sintase); Spm Dyn (espermina sintase). Traduzido por Ivanenkov & Chufarova (2014).

Figura 6. Diferentes atividades de arginase 1 de macrófagos M0 e M2 (nmol urea.µg ptn⁻¹.10min⁻¹) após ativação com diferentes concentrações de 8-Bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate (BrAMPc) e Interleucina-4 (IL-4)*. Foi realizado o cálculo de Média e Desvio padrão dos experimentos.

Figura 7. Microscopia óptica de campo claro de macrófagos (MØs) RAW 264.7, M0 (residentes) e M2 (ativados alternativamente) infectados por *Toxoplasma gondii*, cepa RH, por 2, 24 e 48 horas, tratados ou não com Nor-NOHA (inibidor de ARG1 - 100µM) corados com Giemsa. MØs M0 infectados por 2 h, taquizoítos podem ser visualizados (A) (seta). MØs ativados M2 infectados por 2 h, taquizoítos podem ser visualizados (B) (seta). MØs M0 e ativados M2 infectados por 24 h, taquizoítos podem ser visualizados (C e D) (setas). MØs M0 e ativados M2 infectados e tratados com inibidor de ARG1 por 24 h, taquizoítos podem ser visualizados (E e F) (setas). MØs M0 e ativados M2 infectados por 48 h, taquizoítos podem ser visualizados formando rosácea (G e H) (setas). MØs M0 e ativados M2 infectados tratados com inibidor de ARG1 por 48 h, taquizoítos podem ser visualizados, com formação de rosácea menores (I e J) (setas), respectivamente. Barra =10µm.

Figura 8. Desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em macrófagos (MØs) RAW 264.7 M0 (residentes) e M2 (ativados alternativamente) infectados por 2 h. MØs foram contados e calculado a porcentagem de MØs infectado com parasito (% INF - A), número médio de taquizoíto por vacúolo parasitóforo (número médio taqui/ VP - B) e índice de infecção (índice de infecção taqui/VP - C). Contagem de 100 MØs por lamínula para cálculo de Média e Desvio padrão de 2 experimentos diferentes em quadruplicata. NS= não significativo, pelo *Unpaired t test*.

Figura 9. Desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em macrófagos (MØs) RAW 264.7 M0 (residentes) e M2 (ativados alternativamente) infectados por 24 h e 48 h. MØs foram contados e calculado a porcentagem de MØs infectado com parasito (% INF – A e B), número médio de taquizoíto por vacúolo parasitóforo (número médio taqui/ VP – C e D) e índice de infecção (índice de infecção taqui/VP – E e F). Contagem de 100 MØs por lamínula para cálculo de Média e Desvio padrão de 3 experimentos diferentes em duplicata. **p < 0,01; *p < 0,05; ns= não significativo, pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos (MØs) RAW 264.7 ativados M2 por 24 h, tratados ou não com Nor-NOHA (inibidor de ARG1). MØs M2

não tratados com inibidor de ARG1 (A, C e E) cultivados por 24 h. MØs M2 tratados com Nor-NOHA (100µM) (B, D e F) por 24 h. Nota-se em MØs M2 com e sem inibidor um padrão de encistamento (aparecimento de grânulos de amilopectina, setas em A e B) e *cleft* de membrana (setas em C e D). Rede intravacuolar integra em MØs M2 sem inibidor (seta em E) em relação a rede intravacuolar degradada do MØs M2 com inibidor (seta em F). Barras: 200 nm, 500 nm, 2 µm.

Figura 11. Western blotting da expressão de ARG1 de macrófagos (MØs) RAW 264.7 M0 e ativado M2. Expressão de ARG1 é maior em MØs M2; GAPDH é o controle de carregamento (A). Quantificação dos Western blotting da expressão de ARG1 de MØs M0 e ativado M2 (B). Média e Desvio padrão de 3 experimentos diferentes. **p < 0,01, pelo *Unpaired t test*.

RESUMO

Macrófagos são células do sistema imunológico que apresentam diferentes perfis de ativação, são designados como M0 devido sua função tecido- específica mantendo a homeostasia, M1 na ativação microbicida (inflamatório) caracterizado pela síntese de óxido nítrico através da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e M2 na cicatrização tecidual (anti-inflamatório), sintetizando quantidades elevadas de arginase 1 (ARG1). *T. gondii* infecta as células e pode alterar seu perfil M1 para M2, escapando de sua ação microbicida. Arginase 1 é uma metaloenzima que sintetiza moléculas essenciais, como poliaminas, que estão envolvidas na proliferação celular e possivelmente auxiliam na sobrevivência do parasito. Provavelmente essa enzima ajude na permanência e crescimento de *T. gondii* em macrófagos. Dados preliminares do grupo indicam que a infecção de macrófagos M0 e M2 por *T. gondii* induziu atividade de ARG1 e que a inibição dessa enzima reduz o crescimento do parasito. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a função da ARG1 de macrófagos RAW 264.7, em perfil M0 e M2, estudando a atividade, infecção, ultraestrutura de *T. gondii* em diferentes situações experimentais, expressão e localização de ARG1. Testamos diferentes concentrações de 8-Bromoadenosina 3'-5'- monofosfatada cíclica e Interleucina -4 obtendo a concentração máxima de atividade de ARG1 em macrófagos M2 quando ativados com 1mM de 8-Bromoadenosina 3'-5'- monofosfatada cíclica e 5 ng/mL de Interleucina -4. Não foi detectada diferença de infecção por *T. gondii* após 2 h de interação com macrófagos M0 e M2. Nos tempos de 24 h e 48 h tratados com inibidor de ARG1 houve diminuição de *T. gondii* nos vacúolos parasitóforos em ambos os macrófagos. A ultraestrutura de macrófagos M2 tratados com inibidor de ARG1 e infectados apresentou alteração ultraestrutural de taquizoítos com a presença de grânulos de amilopectina (sugerindo encistamento) e *clefts* de retículo endoplasmático. Em macrófagos M2, houve maior expressão de ARG1 em relação a M0. Não obtivemos marcações de imunofluorescência para ARG1 com a concentração do anticorpo testado. Esses dados contribuem com o entendimento do papel da ARG1 na infecção de *T. gondii* em macrófagos e também no desenvolvimento do parasito.

Palavra-chave: *Toxoplasma gondii*, arginase 1, macrófagos.

ABSTRACT

Macrophages are immune system cells that exhibit different activation profiles, designated as M0 due to their tissue-specific homeostatic function, M1 upon microbicidal activation (inflammatory) characterized by nitric oxide synthesis through the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme, and M2 during tissue repair (anti-inflammatory), synthesizing high levels of arginase 1 (ARG1). *T. gondii* infects cells and can alter their M1 profile to M2, evading its microbicidal action. Arginase 1 is a metalloenzyme that synthesizes essential molecules such as polyamines, involved in cell proliferation and possibly aiding parasite survival. This enzyme likely contributes to *T. gondii* persistence and growth in macrophages. Preliminary data from the group indicate that *T. gondii* infection of M0 and M2 macrophages induces ARG1 activity and that inhibiting this enzyme reduces parasite growth. Thus, the objective of this study was to evaluate the function of ARG1 in RAW 264.7 macrophages, in both M0 and M2 profiles, studying *T. gondii* activity, infection, ultrastructure under different experimental conditions, and ARG1 expression and localization. We tested different concentrations of 8-Bromoadenosine 3'-5'-cyclic monophosphate and Interleukin-4, obtaining maximum ARG1 activity in M2 macrophages when activated with 1mM of 8-Bromoadenosine 3'-5'-cyclic monophosphate and 5 ng/mL of Interleukin-4. No difference in *T. gondii* infection was detected after 2 hours of interaction with M0 and M2 macrophages. However, at 24 and 48 hours, treatment with an ARG1 inhibitor resulted in decreased *T. gondii* in parasitophorous vacuoles in both macrophages. The ultrastructure of M2 macrophages treated with an ARG1 inhibitor and infected showed ultrastructural changes in tachyzoites, with the presence of amylopectin granules (suggesting encystment) and endoplasmic reticulum clefts. M2 macrophages exhibited higher ARG1 expression compared to M0. Immunofluorescence staining for ARG1 was not successful with the tested antibody concentration. These data contribute to understanding the role of ARG1 in *T. gondii* infection in macrophages and parasite development.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, arginase 1, macrophages.

1. INTRODUÇÃO

Os macrófagos (MØs) são células imunológicas heterogênicas, sendo reguladas através do seu fenótipo que é influenciado por estímulos no microambiente celular (Moghaddam *et al.*, 2018). Naturalmente são tecido-específicas (MØ M0), quando estimuladas ativam para duas grandes populações: pró-inflamatória (MØ M1) que agem contra o patógeno através da síntese da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS); e anti-inflamatório (MØ M2) que agem realizando o remodelamento tecidual e proliferação celular, sendo característico pela síntese da enzima arginase 1 (ARG1) (Moghaddam *et al.*, 2018; Yunna, 2020).

A infecção de *T. gondii* é capaz de alterar a ativação de MØs microbicidas M1 (inflamatórios) para M2 (anti-inflamatórios) (Jensen *et al.*, 2011). Uma das características de MØs M2 é a expressão de ARG1 que converte L-arginina em L-ornitina e ureia, sendo a ornitina precursora da biossíntese de poliaminas (Cook *et al.*, 2007). Poliaminas atuam traduzindo proteínas que induzem divisão celular (Pegg, 2009). É possível que *T. gondii* se mantenha e cresça em MØs, pois modulam positivamente a via das poliaminas (Jensen *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2007). Ademais, a indução da ARG1 antagoniza a capacidade microbicida dos MØs contra o parasito, uma vez que a arginina também é o substrato para a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que produz óxido nítrico (NO), um agente microbicida de MØ M1 (Hunter & Sibley, 2012).

No entanto, El Kasmi e colaboradores (2008) demonstraram que *T. gondii* de cepa do tipo II (ME-49) (de virulência intermediária) em camundongo nocaute condicional para ARG1 resulta na sobrevivência do parasito, sugerindo que a falta de ARG1 no camundongo favorece o parasito, possivelmente pela maior disponibilidade de arginina, já que o parasito não sintetiza de novo esse aminoácido (Fox *et al.*, 2004). No entanto, é necessário entender se *T. gondii* utiliza a síntese da ARG1 não somente para suprimir a produção de NO, mas também para a síntese de poliaminas que atuaria facilitando o crescimento e manutenção do parasito, como ocorre com a *Leishmania* (El Kasmi *et al.*, 2008). Diante dessa hipótese, é provável que a ARG1 desencadeie papéis opostos: gerar poliaminas, facilitando o crescimento do parasito e consumir arginina, reduzindo a produção de NO por iNOS; e em contrapartida, reduzir a disponibilidade de arginina, reduzindo a disponibilidade

desse aminoácido necessário para o crescimento de *T. gondii* (Hunter & Sibley, 2012).

A infecção por *T. gondii* induz uma cascata de sinalização que gera expressão de ARG1, desse modo reduzindo a via inflamatória (M1) tornando o MØ menos microbicida (Jensen *et al.*, 2011). Isso sugere que *T. gondii* pode utilizar a maquinaria do perfil M2 para a sobrevivência dentro de MØ. Entretanto há pontos dessa modulação macrofágica causada pela infecção que necessitam serem elucidados. Entender o papel desta enzima quando MØs são infectados e como *T. gondii* pode utilizá-la como estratégia de evasão, para crescimento e manutenção dentro da célula hospedeira, irá auxiliar no esclarecimento de pontos contraditórios relacionados a essa via enzimática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose que atinge mais de um terço da população mundial, no entanto uma pequena porcentagem (10-15%) das pessoas infectadas irá desencadear a forma grave da doença (Flegr *et al.*, 2014; Stanic & Fures, 2020). É a infecção de maior prevalência em humanos, acomete mais indivíduos do que a tuberculose latente, sendo uma das doenças zoonóticas mais prejudiciais do mundo (Flegr *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2021). O agente etiológico da doença é o protozoário intracelular obrigatório *T. gondii*, a doença é mais presente em países socioeconomicamente desfavorecidos (Flegr *et al.*, 2014; Stanic & Fures, 2020; Smith *et al.*, 2021). Um estudo desenvolvido por Scallan e colaboradores (2011) nos Estados Unidos da América, listou a toxoplasmose como a quarta causa mais comum de hospitalização proveniente de doenças transmitidas por alimentos, acendendo um alerta no sentido de políticas de intervenções de segurança alimentar e hábitos de higiene na população.

A doença é normalmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, porém em indivíduos imunossuprimidos pode levar a manifestações clínicas. Os sinais clínicos da doença podem variar de leves a graves, como toxoplasmose ocular e até se mostrarem fatais em indivíduos imunocomprometidos e em fetos em desenvolvimento. Esses sintomas variam conforme modo de infecção, genótipo da cepa, quantidade de parasito e sistema imune do indivíduo (Aguirre *et al.*, 2019). Em gestantes, o parasito pode atravessar a placenta, atingindo o feto resultando em

complicações neurológicas, aborto e morte (Maldonado *et al.*, 2017). Entretanto, dependendo do estado imune do indivíduo ou o genótipo da cepa, pode-se manifestar a toxoplasmose ocular, sendo adquirida de forma congênita ou pós-natal (Flegr *et al.*, 2014). Indivíduos imunocompetentes quando infectados através da forma infectante esporozoíto ou bradizoíto, permanecem assintomáticos e não necessitam de intervenções médicas. Isso acontece, pois, a forma infectante só é convertida na fase aguda (taquizoíto), quando há uma depleção no sistema imunológico (Smith *et al.*, 2021; Portes *et al.*, 2018; De Souza *et al.*, 2010).

2.2. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo apicomplexa, causador da toxoplasmose, que infecta diversos vertebrados de sangue quente como animais silvestres e domésticos (Aguirre *et al.*, 2019; Maldonado *et al.*, 2017). O protozoário tem a capacidade de infectar qualquer célula nucleada, contudo estudos *in vivo* demonstram que comumente infecta MØs e células dendríticas, usando-as como “cavalo de troia” contribuindo para que ocorra a disseminação do parasito no hospedeiro e acesso a locais imunoprivilegiados como cérebro e retina (Bierly *et al.*, 2008; Courret *et al.*, 2006; Da Gama *et al.*, 2004). Possui um ciclo de vida com quatro formas infectantes: taquizoíto (estágio infectante na célula, presentes no ciclo lítico, forma aguda), bradizoíto (estágio infectante em cistos teciduais, crescimento lento, forma crônica), esporozoíto (estágio infectante em oocistos esporulados) e merozoíto (ciclo sexuado no intestino dos felídeos) (Aguirre *et al.*, 2019).

Taquizoítos, possuem uma forma alongada, medindo cerca de 6-8 μm de comprimento por 2 μm de largura, sendo caracterizados pela região anterior afilada (complexo apical) onde se encontram os dois anéis apicais: o superior medindo 160 nm e o posterior com 200 nm, esse complexo situa na extremidade anterior do corpo do parasito (Attias *et al.*, 2014). Esse complexo é encarregado por fixar e penetrar o parasito na célula hospedeira, sua estrutura é constituída de conóide anterior, anéis polares, róptrias e micronemas. A região mediana é composta pelo núcleo, complexo de Golgi e o apicoplasto. A parte do envoltório nuclear que se estende pelo citosol, é composta pelo retículo endoplasmático (RE). A mitocôndria é ramificada no citosol. Os grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina estão dispersos pelo corpo do parasito. Todo o envoltório parasitado é circundado pela película, logo abaixo está presente o anel polar posterior e em seguida os microtúbulos

subpeliculares que transpassam todo o corpo celular. O conóide, é constituído de tubulina, com uma organização estrutural de fibras em espiral contendo dois anéis polares constituídos de microtúbulos que se estendem até a região apical do parasito como demonstrado na figura 1 (Attias *et al.*, 2014; Attias & Souza, 2021; De Souza *et al.*, 2010).

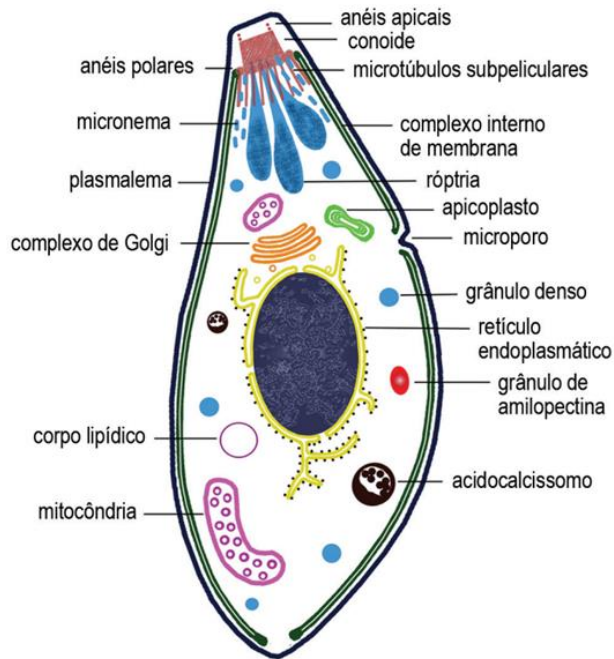


Figura 1. Representação esquemática da forma taquizoíto de *Toxoplasma gondii* e suas organelas. De Souza e colaboradores, 2010.

Toxoplasma gondii é cercado por três camadas de membrana, constituindo a película. A externa que é a membrana plasmática e as duas internas sendo parte do complexo da membrana interna (IMC). Toda essa estrutura da película com os elementos do citoesqueleto possibilita que o parasito possua a capacidade de realizar um mecanismo de deslizamento (*gliding*) para que se locomova e penetre na célula hospedeira, mesmo diante da ausência de apêndices locomotores como: cílios, flagelos ou pseudópodes (Attias *et al.*, 2014; Attias & Souza, 2021; De Souza *et al.*, 2010).

As róprias são organelas que tem como estrutura uma região basal mais ampliada onde é secretado as proteínas róprias (ROPs), em conjunto com uma rede central de formato esponjoso, com uma porção mais afilada, denominada como pescoço da organela, onde é secretado às proteínas do pescoço das róprias (RONs). Taquizoítos têm em média de sete a 14 róprias. É circundada por uma membrana, que contém proteínas básicas. As ROPs são produzidas no RE,

atravessam o complexo de Golgi, são liberadas na porção basal e são secretadas no citoplasma da célula hospedeira. Essas proteínas são encarregadas de liberar conteúdos de virulência durante os processos de invasão (De Souza *et al.*, 2010; Attias *et al.*, 2014).

Os grânulos densos são organelas arredondadas, que estão presentes no corpo do parasito. São responsáveis por secretar os conteúdos de virulência na fase intracelular do ciclo. As proteínas dos grânulos densos (GRAs) estão presentes na membrana do vacúolo parasitóforo (PVM) e na rede intravacuolar. Enquanto GRA3, GRA5, GRA7 e GRA8 são englobadas à PVM, às GRA2, GRA4, e GRA6 estabelecem um complexo que se comunicam com as membranas da rede intravacuolar (De Souza *et al.*, 2010; Attias *et al.*, 2014).

Os grânulos de amilopectina possuem uma forma oval com dimensões que variam de 180 nm a 250 nm, presentes em grande quantidade na forma infectante bradizoítos e esporozoítas e exibem características elétron-lucentes em preparações convencionais para visualização em microscopia eletrônica de transmissão. Esses grânulos são encontrados dispersos em todo o citoplasma ou agrupados e contém uma composição bioquímica semelhante ao do amido. É sugerido que essas estruturas atuem como reserva de energia para às formas infectantes, que são conhecidas por sua capacidade de permanecerem viáveis por longos períodos (Attias *et al.*, 2014; Coppin *et al.*, 2003).

O ciclo de vida complexo do parasito pode ser dividido em duas fases distintas: assexuada ocorrendo em hospedeiros intermediários, como animais vertebrados de sangue quente (aves e mamíferos) e recentemente visto em animais de sangue frio (ostras) e hospedeiros definitivos (da família *Felidae*), sendo o gato o hospedeiro definitivo mais comum; e fase sexuada ocorrendo no intestino dos hospedeiros definitivos (Barbosa *et al.*, 2014; Weiss & Kim, 2011). Dentro do intestino do gato infectado, os bradizoítos atravessam os enterócitos do tecido epitelial intestinal, posteriormente ocorre a replicação dos merozoítos e desenvolvimento de gametócitos, levando a formação de oocistos que serão eliminados nas fezes e esporulados no meio ambiente dentro de 3-4 dias (Hunter & Sibley, 2012).

O oocisto esporulado pode ser ingerido por hospedeiros intermediários de consumo ou convívio humano (Hunter & Sibley, 2012). A transmissão pode ocorrer pela via horizontal através da ingestão de oocistos ou cistos teciduais presentes em alimentos ou água contaminada; e pela via vertical através da placenta por onde

taquizoíto penetra como exposto na figura 2 (Barbosa *et al.*, 2014; Weiss & Kim, 2011).

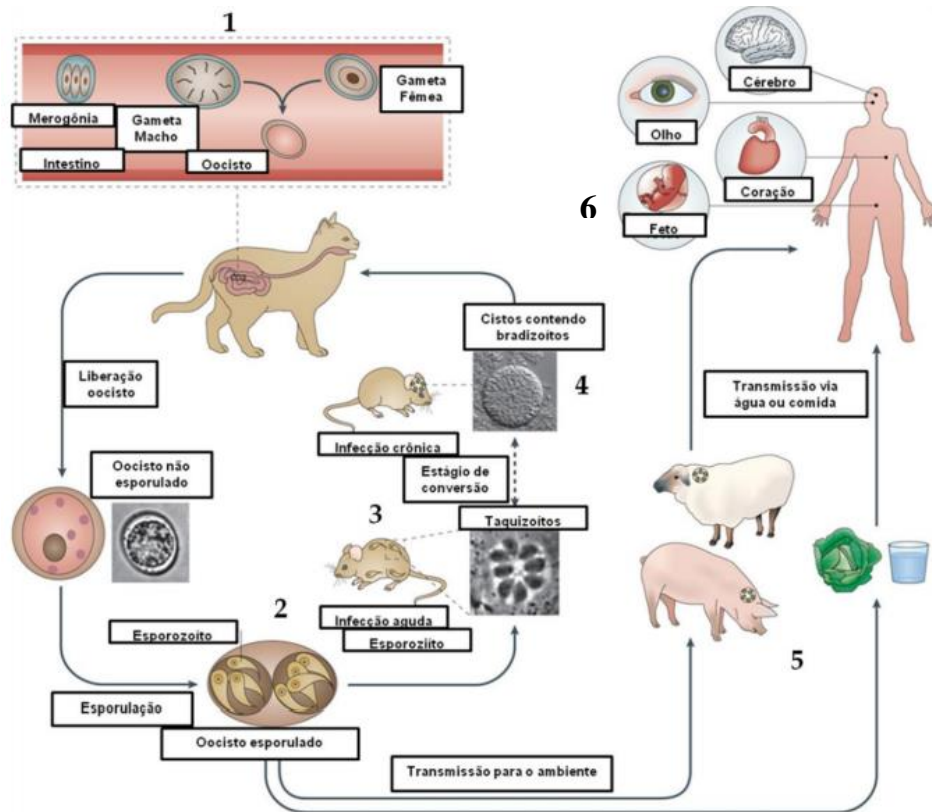


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Processo de replicação dos merozoítos dentro dos enterócitos do gato (fase sexuada) e liberação dos oocistos não esporulados pelas fezes felíneas (1); Fusão dos gametas e a formação dos oocistos esporulados no ambiente (2); A fase assexuada se sucede nos hospedeiros intermediários e definitivos através da contaminação de oocistos esporulados no ambiente e conversão em taquizoítos (3); os taquizoítos se convertem em bradizoítos formando cistos (4); a contaminação de água e alimentos pelos oocistos esporulados no ambiente ou pela ingestão de cistos teciduais e transmissão horizontal para os seres humanos (5); transmissão vertical através da placenta da mãe contaminada para o feto (6). Traduzido de Hunter & Sibley (2012).

A forma infectante taquizoíto é capaz de disseminar rapidamente pelo hospedeiro vertebrado e não possui especificidade pela célula hospedeira, infectando diferentes células nucleadas (Bierly *et al.*, 2008; Courret *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2019). Assim que ocorre o estabelecimento da infecção dentro da célula hospedeira, *T. gondii* inicia um processo de divisão por endodiogenia, de 6-8 horas (*in vitro*) e pode gerar de 64 a 128 parasitos, essa divisão é rápida pela capacidade do parasito em romper às células e infectar outras células em um processo denominado de ciclo lítico (Goldman *et al.*, 1958; Black & Boothroyd, 2000; De Souza *et al.*, 2010).

T. gondii invade o epitélio intestinal, após a ingestão de cisto tecidual ou oocisto esporulado, se espalha no organismo tornando-se sistêmico e formando cistos no tecido cerebral e muscular (Baneth *et al.*, 2015). Durante o processo de invasão na célula hospedeira, ocorre inicialmente através da adesão inicial onde envolve o reconhecimento de receptores de superfície na membrana da célula hospedeira. Posteriormente, ocorre a adesão apical onde é secretado o conteúdo dos micronemas que são chamados de MICs, são proteínas que auxiliam na fixação, adesão na membrana plasmática da célula hospedeira e auxiliam na formação da junção móvel (Attias *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2005; Butcher *et al.*, 2011; Saeij *et al.*, 2007).

Após a adesão, inicia-se a formação de uma junção móvel entre as membranas plasmáticas do parasito e da célula hospedeira. Durante o processo de invasão e estabelecimento do parasito, ocorre associação da membrana plasmática de *T. gondii* com a célula hospedeira, formando uma estrutura conhecida como junção móvel, é criado um ambiente intracelular conhecido como vacúolo parasitóforo (VP), onde o parasito obtém nutrientes, realiza sua replicação, fica protegido e secreta proteínas (Attias & Souza, 2021; Attias *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2005; Sibley, 2003).

A formação do VP é completada pela secreção de proteínas do pescoço de rópria (RON2, RON4 e RON5) conjuntamente com MIC AMA1 que auxiliam na formação da junção móvel, possibilitando a entrada ativa do parasito na célula hospedeira (Hunter & Sibley, 2012; Attias & Souza, 2021). No VP, *T. gondii* secreta diferentes fatores de virulência via liberação do conteúdo das organelas: róprias (ROP5, ROP16, ROP17 e ROP18) e grânulos densos (GRA3, GRA5, GRA7, GRA8, GRA9 e GRA10) (Attias *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2005). Essas proteínas migram para dentro da célula hospedeira, tornando o VP metabolicamente ativo para o crescimento do parasito e manipulando a sinalização celular do hospedeiro. Alguns dos diferentes fatores de virulência secretados pelo parasito ficam dentro do VP, outros na PVM e uns vão para o citosol e núcleo da célula hospedeira acionando cascatas de sinalização que alteram a transcrição gênica no núcleo (Hunter & Sibley, 2012; Hakimi *et al.*, 2017; Attias & Souza, 2021; Attias *et al.*, 2014).

As cepas de *T. gondii* são classificadas classicamente de acordo com a virulência e o genótipo, sendo do tipo I (RH), II (ME-49) e III (VEG) (Howe & Sibley, 1995). Cada uma dessas cepas apresenta fenótipos distintos em camundongos,

estando relacionado às proteínas sintetizadas pelo parasito, atribuindo à essas cepas características como: virulência, persistência e expressão de citocinas (Jensen *et al.*, 2011; Hunter & Sibley, 2012). A virulência das cepas para camundongo envolve um conjunto de proteínas polimórficas, como as ROPs 5,16,17 e 18. Esse conjunto de proteínas tem a capacidade de neutralizar, por fosforilação, GTPases associadas a imunidade (IRGs) da célula hospedeira reduzindo sua capacidade microbicida. As diferenças entre às cepas estão relacionadas ao polimorfismo dessas proteínas (Hunter & Sibley, 2012; Hakimi *et al.*, 2017).

As cepas do tipo I, são consideradas de maior virulência, são letais para camundongos; as do tipo II, têm uma virulência intermediária, e as do tipo III são consideradas avirulentas. A do tipo I e III, expressam o complexo ROP16-18, atribuindo maior capacidade de virulência. No entanto, a do tipo III expressa níveis baixos de ROP18, reduzindo a capacidade de fosforilar IRGs da célula hospedeira. Somente a cepa do tipo I possui o complexo ROP 5,16,17,18 sendo capaz de escapar dos sistemas microbicidas da célula hospedeira. A ROP 16 da cepa tipo I, é capaz de ativar e sustentar o sinal de transcrição STAT3 e STAT6 (transdutoras de sinal e ativadores de transcrição). Esses transdutores diminuem a indução de IL-12, uma citocina importante na resposta inflamatória da célula hospedeira, aumentando assim a carga parasitaria (Butcher *et al.*, 2011; Saeij *et al.*, 2007; Hunter & Sibley, 2012). ROP16 também induz a síntese de ARG1 (Hunter & Sibley, 2012).

2.3. Macrófagos

Os MØs são células do sistema imunológico inato que estão distribuídos em diversos tecidos do corpo, sendo heterogêneos com diferentes fenótipos e funções tecido-específicas (como manter a homeostasia tecidual, inflamação, defesa do hospedeiro e reparo tecidual) (Wang *et al.*, 2021; Heinrich *et al.*, 2017). Essas células respondem a diferentes estímulos em seu microambiente celular assumindo perfis de ativação distintos. O perfil M0 tem função tecido-específica mantendo a homeostasia com reduzida capacidade microbicida, possui componentes solúveis que atuam sinergicamente em mudanças fisiológicas teciduais, pela capacidade de alteração no perfil de expressão gênica e a plasticidade fenotípica (Hunter & Sibley, 2012; Heinrich *et al.*, 2017).

O perfil M1 é estimulado por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e presença de lipopolissacarídeo (LPS); esses ativa diversos fatores antimicrobianos, estimulam a síntese de reativos de oxigênio e nitrogênio (agentes

microbicidas que limitam a replicação do parasito) e podem reduzir a infecção. Produtos microbianos como: LPS que estão presentes na parede de bactérias gram-negativas, são reconhecidos pelos receptores *Toll-like* (TLR) (TLR2 e TLR4) presentes na membrana celular dos MØs. Esses receptores sinalizam a síntese de fatores pró-inflamatórios como: IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF) (cofator na atividade microbiana). TNF- α , IL-1 β e LPS, estimulam a expressão de iNOS nos macrófagos, resultando em produção de altos níveis NO, molécula microbicida que controla a replicação parasitária sendo um mecanismo essencial contra patógenos (Hunter & Sibley, 2012; Heinrich *et al.*, 2017; Lavin *et al.*, 2014; Yunna *et al.*, 2020).

Macrófagos ativados M2 atuam no reparo tecidual, angiogênese, imunorregulação e deposição de colágeno. Possuem baixa capacidade microbicida e são estimulados com citocinas anti-inflamatórias como: IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , e outros ligantes como adenosina monofosfato cíclica (AMPc) como demonstrado na figura 3 abaixo (Mills, 2012; Fouce *et al.*, 2012). O perfil M2 é caracterizado pela expressão de ARG1.

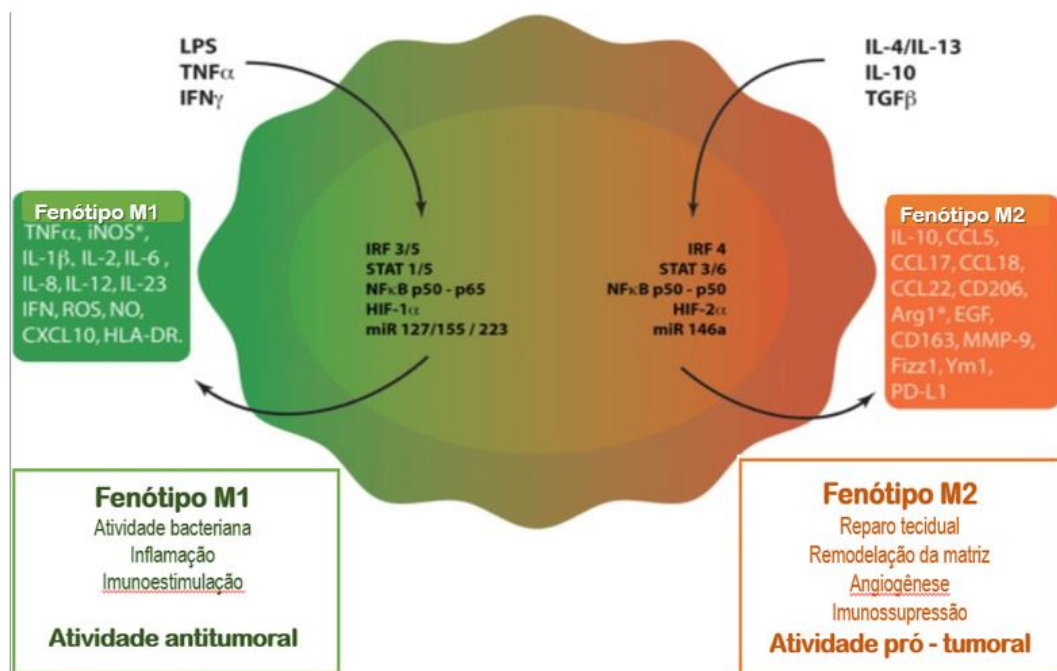


Figura 3. Representação dos perfis de ativação de macrófagos M1 e M2 e suas funções metabólicas. Estímulos M1: LPS (lipopolissacarídeo); TNF α (Fator de necrose tumoral alfa); IFN γ (Interferon-gama). Fatores de regulação de transcrição M1: (IRF / STAT) (IRF3, IRF5, STAT1 e STAT5); heterodímero do fator nuclear ativo kappa B (NF κ B) (p50-p65); HIF1; miR127, miR155 e miR223. Citocinas liberadas em macrófagos M1: (TNF α IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, IFN γ); Quimiocinas: (CXCL10); iNOS (óxido nítrico sintase); NO (óxido nítrico); HLA-DR (Receptor de superfície celular de antígeno leucocitário humano). Estímulos M2: IL-4; IL-13; IL-10; TGF β (fator de

crescimento transformador β). Fatores de regulação de transcrição M2: (IRF/STAT) (IRF4, STAT 3 e STAT6); homodímero inibitório NF κ B (p50-p50); HIF2. miR146a. Citocinas liberadas em macrófagos M1: (IL-10); Quimiocinas: (CCL5, CCL17, CCL18, CCL22); outras proteínas (CD163, CD206, ARG1, MMP-9, Fizz-1, Ym-1 e PD-L1). Traduzido de Genard e colaboradores (2017).

Visando compreender melhor o comportamento macrofágico diante de infecções, como a causada pelo *T. gondii*, diferentes análises sobre biologia dos MØs são realizadas por grupos de pesquisas utilizando diferentes linhagens de MØs. Um exemplo são MØs peritoneais, células de cultura primária que não possuem modificação genética superiores como a linhagem imortalizada RAW 264.7 (Gordon & Pluddemann 2017). Isso confere diferentes níveis de NO e atividade de ARG1. MØs peritoneais atuam na manutenção da homeostase tecidual do peritônio, controle de infecções e patologias inflamatórias (Okabe & Medzhitov 2014, Dahdah *et al.*, 2014, Davies *et al.*, 2013).

Linhagens macrofágicas imortalizadas são induzidas em camundongos, com o propósito de pesquisar as funções dos MØs no sistema imunológico, a exemplo da linhagem J774.A1 e a RAW 264.7 (Davies *et al.*, 2013). MØs J774.A1 são derivados de tumor ascítico de um camundongo BALB/c, sendo uma linhagem imortalizada com características semelhantes a RAW 264.7. A linhagem celular RAW 264.7 foi obtida a partir da infecção de camundongo BALB/c com injeção intraperitoneal do *leukemia vírus*. Dessa forma, MØs RAW 264.7 tem a capacidade de proliferar em cultura celular e manter características fenotípicas semelhantes aos macrófagos primários e são amplamente utilizadas em estudos sobre resposta imune, inflamação e infecção (Tangsudjai *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2018, Cabral *et al.*, 2018). Estudos do grupo com MØs J774.A1, RAW 264.7 e peritoneais observaram que a atividade de ARG1 em MØs peritoneais é superior do que em RAW 264.7, indicando um fenótipo mais inflamatório em RAW 264.7 e anti-inflamatório em MØs peritoneais.

As cepas do tipo I e III provocam em MØs um perfil de expressão gênica relacionado com a ativação M2, auxiliando na permanência e crescimento de *T. gondii* na célula hospedeira (Hunter & Sibley, 2012). A ativação M2 necessita em grande parte da ROP 16. Jensen e colaboradores (2011) infectaram MØs com diferentes cepas de *T. gondii* e observaram o aumento da atividade de ARG1 e proliferação de *T. gondii*. Esses dados sugerem que *T. gondii* pode utilizar a via da ARG1 para seu crescimento com o envolvimento da ROP16. O balanço entre os

perfis M1-M2 é fundamental para manter a homeostasia tecidual. No entanto, esse paradigma é uma visão geral de dois extremos de fenótipos, nesse processo há outras subpopulações (Yunna *et al.*, 2020). *T. gondii* consegue modular MØs M1 para o ativados M2 através de diferentes mecanismos evasivos, sendo a indução da secreção de TGF- β mostrada pelo grupo (Seabra *et al.*, 2004).

2.4. Arginase 1

Arginase 1 (citosólica) é uma metaloenzima homotrimérica manganase binuclear (Figura 4). Essa enzima participa do ciclo da ureia, catalisando a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e ureia. A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, sendo importante para a síntese de diversos metabólitos importantes para a célula (Gonçalo *et al.*, 2020; Morris *et al.*, 1998).

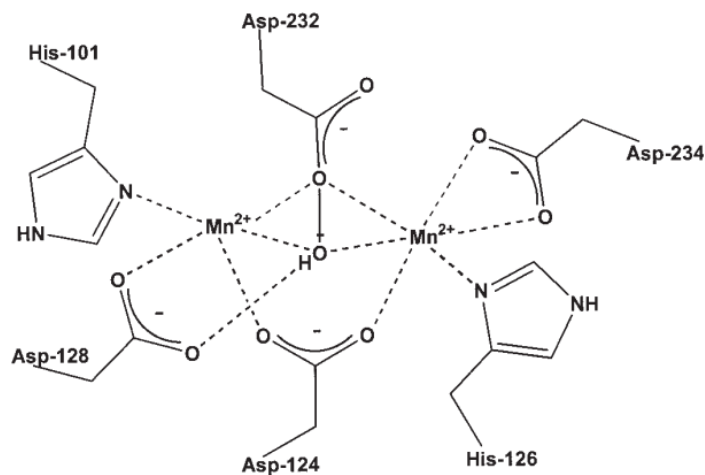


Figura 4. Estrutura química da arginase 1 Ash (2004).

ARG 1 catalisa a via metabólica para a síntese e catabolismo da arginina (Wu & Morris, 1998). Ocorrem diversas mudanças no metabolismo da arginina diante da infecção por *T. gondii*, como respostas inflamatórias para a síntese de metabólitos inflamatórios como NO e anti-inflamatórias para produção de poliaminas (Figura 5).

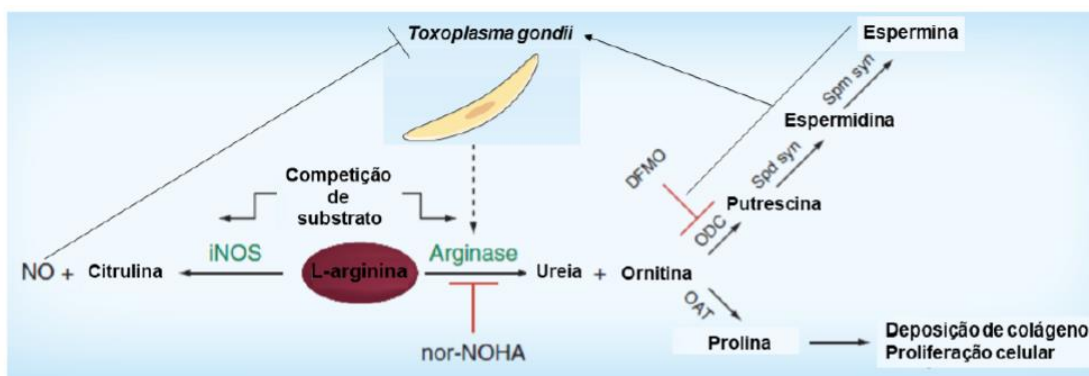


Figura 5. Metabolismo da arginina e interação entre enzima óxido nítrico sintase induzida e arginase 1, na infecção por *Toxoplasma gondii*. NO (óxido nítrico); iNOS (óxido nítrico sintase); Nor-NOHA

(inibidor de arginase); OAT (ornitina amino transferase); ODC (ornitina) descarboxilase); Spd Syn (espermidina sintase); Spm Dyn (espermina sintase). Traduzido por Ivanenkov & Chufarova (2014).

A porção binuclear de manganês na presença das ligações de hidrogênio desempenha um papel importante na estabilização e orientação do nucleófilo catalítico, que é um íon hidroxila responsável pela ligação com o metal. Quando ocorre a diálise do Mn_A^{2+} da ARG1 nativa ou quando os ligantes são substituídos tanto no Mn_A^{2+} quanto para Mn_B^{2+} na ARG1, observa-se uma redução de até 20.000 vezes na taxa de catálise k_{cat} por causa desestruturação da porção metálica. Os inibidores ideais de arginase são os que contêm porções de *N-hidroxi-guanidínio* ou ácido borônico que atuam na porção binuclear de manganês (Christianson, 2005). A inibição da síntese de ARG1 pode ocorrer através de inibidor específico da via enzimática. Tenu e colaboradores (1999) descreveram a capacidade do *Ng-hydroxy-Nor-L-Arginine* (Nor-NOHA) como inibidor seletivo da via de ARG1 inibindo a hidrólise de L-arginina em L-ornitina em macrófagos murinos, sendo capaz de interagir com a porção $(Mn^{II})_2$ do sítio ativo, com a função *N-hidroxi-guanidínio* em sua cadeia lateral.

A expressão ARG1 é estimulada pelo *T. gondii* via liberação de fatores de virulência, como a ROP 5,16,17 e 18 e GRA 5, 7, 8, 9 e 10 (Hunter & Sibley, 2012; Morris *et al.*, 1998; Hakimi *et al.*, 2017). Os MØs alteram seu perfil de M1 para M2 induzido por IL-4 e IL-13, ativando vias de sinalização dependentes de STAT3-STAT6 que leva a indução de ARG1 na célula hospedeira. A infecção por *T. gondii* induz a síntese de ARG1 e funciona em parte para suprimir a produção de NO na infecção intracelular (Li *et al.*, 2012). As poliaminas são moléculas orgânicas que regulam diversos processos celulares como: cicatrização tecidual, replicação do DNA, tradução de proteínas e proliferação celular, sendo fundamental na manutenção das células, incluindo o parasito intracelular (Pegg, 2009; Gonçalo *et al.*, 2020). São moléculas essenciais para a proliferação e funcionalidade de todas às células eucarióticas, sendo críticas para sobrevivência das células. A via ornitina descarboxilase (ODC) catalisa a descarboxilação da L-ornitina, formando a primeira poliamina, putrescina que é convertida em espermidina e espermina por enzimas subsequentes dessa cascata, como visto na figura 5 (Cook *et al.*, 2007).

Dados preliminares do grupo por imunofluorescência sugerem a associação da ARG1 aos microtúbulos dos MØs. Os microtúbulos são polímeros da proteína tubulina (α - tubulina e β - tubulina) que fazem parte do citoesqueleto celular,

responsável pela manutenção da célula, realizando processos mitóticos entre outros processos celulares (Brown *et al.*, 2014). Esses dados devem ser testados, utilizando compostos que alteram a polimerização ou a despolimerização dos microtúbulos, entre outras metodologias *in vitro*. Pouco se sabe como a ARG1 afeta no desenvolvimento do parasito em MØs e se a infecção modula a localização, expressão e atividade dessa enzima.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel de ARG1 em MØs RAW 264.7 em perfil M0 e M2 infectados ou não por *Toxoplasma gondii*, cepa RH.

3.2. Objetivo Específico

- Avaliar a atividade de ARG1 em MØs M0 e M2;
- Avaliar as alterações na morfologia com ou sem inibidor de ARG1 de MØs M0 e M2 infectados e verificar o desenvolvimento do parasito;
- Avaliar as alterações na ultraestrutura da forma taquizoíta de *T. gondii* tratados ou não com inibidor de ARG1;
- Avaliar a expressão de ARG1 em MØs M0 e M2;
- Localizar ARG1 em MØs M0 e M2 infectados e não infectados por *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura e ativação macrófagos RAW 264.7

A linhagem RAW 264.7 de MØs murinos foram cultivados em garrafas de 25cm² com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma - 1152) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, GBICO-12657029) à 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂. Quando os MØs RAW 264.7 formaram monocamada celulares os MØs foram soltos da garrafa de cultura mecanicamente. As células foram centrifugadas a 500g por 10 min à 20°C, ressuspendidas em DMEM a temperatura ambiente, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas (5x10⁵ células por poço) em placas de 24 poços com lamínulas de vidro por 2 h. Posteriormente as células RAW 264.7 foram mantidas por 24 h em perfil M0 sendo cultivadas com 400 µl de DMEM e 2 % de SFB e 0,1 % de estreptomicina; para ativação M2 utilizamos diferentes concentrações de IL- 4 (1; 2,5; 5; 10; 25 ng/mL - recombinante de camundongo – Peprotech, 212-14) e Br-AMPc (0,01; 0,02; 0,50; 1; 2,5; 12,5 mM - Sigma, B5386)

em DMEM suplementado com 2 % de SFB na estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂.

4.2. Obtenção de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii cepa RH foi mantida através de passagens de 2-3 dias por lavado peritoneal de camundongos suíços com 3-5 mL com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). A obtenção dos taquizoítos foi realizada através de lavado peritoneal onde foi centrifugado a 1000g por 10 min à 4°C, ressuspensos em 1mL de DMEM e contados em câmara de Neubauer. Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UENF: protocolo número 514 (Modulação de macrófagos peritoneais de camundongo infectados por *Toxoplasma gondii*: sistema microbicida de óxido nítrico, metabolismo e receptores de ativação e transporte de arginina, aprovado em 10/2022).

4.3. Infecção dos macrófagos perfil M0 e M2

Após 24 h, os MØs foram infectados com *T. gondii* na proporção 1:1 a 37°C por 2 h. As células foram cultivadas em perfil M0 e ativadas no perfil M2 com e sem Nor-NOHA a 100µM nos tempos de 24 e 48 h na estufa à 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂. Após o cultivo, às células foram coradas com Giemsa (item 4.4.).

4.4. Morfologia dos macrófagos

Macrófagos em distintas situações foram fixados com PBS contendo 4 % de formaldeído, lavados com PBS e duas vezes com água destilada, corados com Giemsa (Sigma-Aldrich - P3288) na proporção 1:10 por 5-10 min. Posteriormente, as lamínulas foram imersas na bateria de acetona – xilol: 1) 100 % acetona; 2) 70 % acetona – 30 % xilol; 3) 30 % acetona – 70 % xilol; 4) 10 % acetona – 90 % de xilol; 5) 100 % xilol. Posteriormente, as lâminas foram montadas colocando as lamínulas sobre gotas de Entellan. Após secagem do Entellan, as células foram observadas por microscopia óptica de campo claro no microscópio *Zeiss AxioPlan*, quantificadas e imagens das lamínulas de 2, 24 e 48 h foram capturadas em câmera digital. O índice de infecção foi obtido por contagem direta de 100 MØs por lamínula, avaliando a porcentagem de MØs infectados, número médio de taquizoíto por VP e a multiplicação desses 2 valores gerou o índice de infecção.

4.5. Atividade de ARG1

A atividade de ARG1 de MØs M2 foi avaliada após ativação em diferentes concentrações de ativadores, a partir da produção de ureia de acordo com Corraliza e colaboradores (1994). Para avaliar a atividade enzimática da ARG1 MØs RAW

264.7 foram semeados na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de 24 poços, ativadas como já descrito no item (4.1). Depois de 24 h às células foram lisadas com tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% de Triton X-100, inibidor de protease (Sigma-Aldrich, P8340), e incubado no Shaker (Cientec - 151) a 100g por 30 min em temperatura ambiente. Foi adicionado 10 μ l da solução contendo 10 mM $MnCl_2$ em 150 μ l do lisado, e às amostras foram aquecidas à 56°C por 15 min. Depois da ativação da ARG1, foi adicionado 0.5 M L-arginine (Sigma) (pH 9.7), às amostras foram incubadas à 37°C por 40 min, a reação parada com a adição de 50 μ l de solução contendo H_2SO_4 , H_3PO_4 e H_2O na proporção 1:3:7, respectivamente. A produção de ureia foi revelada pela adição de solução contendo 9 % de α -isonitrosopropiophenone, aquecendo à amostra em 100°C por 40 min. A amostra adquiriu coloração rosada e com a curva padrão da ureia às amostras foram lidas em leitor de microplacas em 540 nm (Molecular Devices).

4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar a ultraestrutura do taquizoítos os MØs RAW 264.7 foram semeados em placa de 6 poços na densidade de 2×10^6 células, ativadas e infectadas como já descrito nos itens (4.1, 4.2, 4.3). Os procedimentos para MET foram feitos de acordo com o protocolo de Rocha e colaboradores (2023) com adaptações. As amostras foram fixadas durante 2 h em solução contendo glutaraldeído à 2.5%, tampão cacodilato de sódio 0,2 M e paraformaldeído. Após fixação, os MØs M2 infectados com ou sem inibidor de ARG1 foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 10 min. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, ferrocianeto de potássio 1,6% ($K_4Fe(CN)_6$), em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h, em ambiente protegido de luz. Posteriormente, MØs M2 infectados foram lavados três vezes com cacodilato de sódio 0,1 M por 10 min. As amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de acetona (30%-100%) seguida de infiltração em resina epóxi. Em seguida, as amostras permaneceram por 48 h à temperatura de 60° C para a polimerização. Secções ultrafinas das amostras foram obtidas e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. Posteriormente as amostras foram observadas e imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM-1400Plus.

4.7. Expressão e Localização de ARG1

4.7.1. Western Blotting

A expressão da proteína de ARG1 foi avaliada através da metodologia de *western blotting*. As células foram semeadas em placas de 6 poços (2×10^6), ativadas como já descrito no item (4.1). A concentração de proteínas total da amostra foi avaliada através do kit de dosagem de proteínas BCA, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante (Bio-Rad). Após a dosagem, todas as amostras foram ajustadas para a concentração de 2 ug/ul. Dessa forma, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE 10 %, que permite visualizar proteínas de 35 a 38 kD como a ARG1. Cada poço recebeu um volume de 20 µl de amostra. As amostras correram por 90 min em voltagem constante de 80 v por gel utilizando tampão de corrida SDS-PAGE pH 8,3 (*BioRad PowerPack 1000*). Posteriormente as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond) por 90 min a 60Ma (*PowerPac™ HC, Biorad*). A eficácia da transferência foi observada através da revelação das proteínas na membrana feita com o vermelho de Ponceau (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% ácido acético glacial, diluído em água destilada). Posteriormente, realizou-se a incubação da membrana em solução de bloqueio (leite em pó desnatado Molico a 5% diluído em TBS-T) por 2 h a fim de bloquear os sítios inespecíficos.

As membranas bloqueadas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários: anti-ARG1 de camundongo (Santa Cruz, SC - 271430) com a diluição de 1:300 ou 1:500 e com α -GAPDH de camundongo de 36kD (Sigma (Mai - 16757) com diluição 1:1000 diluídos em solução de bloqueio. GAPDH (mouse) foi utilizado como padrão de carregamento de proteína. Posteriormente a membrana foi lavada com TBS-T e incubada por 60 minutos com os anticorpos secundários: IRDye 800 CW α -goat (Li-cor 926-32214) com diluição 1:20.000; IRDye 680 LT α - goat (Li-cor 926-68024) com diluição 1:20.000; IRDye 680 LT α - mouse (Li-cor 926-68020) com diluição 1:20.000 e IRDye 800 CW α -rabbit (Li-cor 926-68021) com diluição 1:20.000. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBS-T para posterior revelação em sistema Odyssey Licor. Após a revelação, as imagens foram obtidas no Software Li-cor e analisadas no software FIJI (Image J) para análise de densidade óptica das bandas.

4.7.2. Imunofluorescência

Lamínulas com MØs M0 e ativados M2 foram fixados com formaldeído 4% em PBS após 24 h de cultivo. As células foram incubadas por 30 min com PBS contendo 100 mM de NH₄Cl. As células foram tratadas com 0,5% de Triton X-100 em PBS por 15 min e lavadas duas vezes com PBS-BSA (1,5%). As células foram incubadas com anticorpo anti-ARG1 de camundongo (Santa Cruz, SC-271430) diluído 1:100 em PBS-BSA por 1 h, lavadas com PBS-BSA e incubada com anticorpo secundário *Alexa Flour 488* rabbit anti-mouse na proporção 1:200 em 1,5 % de PBS-BSA, por 1 h ao abrigo da luz (Seabra *et al.*, 2002). Posteriormente foram visualizados pelo microscópio de fluorescência pelo programa *Axiovision*.

4.8. Análise Estatística

Com o intuito de detectar diferenças entre o grupo de MØ M0 e M2 infectado ou não por *T. gondii*, avaliamos através do teste ANOVA One-way, em seguida pelo pós- teste Tukey e pelo teste t. Foram calculados médias e desvio padrão dos experimentos realizados com GraphPad Software Prism 5.0, com $P \leq 0,05$ para verificar a significância.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade de ARG1 com diferentes concentrações de ativadores

Objetivando gerar MØs RAW 264.7 no ativado M2 com o máximo de atividade de ARG1, foram realizados ensaios enzimáticos da atividade de ARG1 após 24 h de ativação com BrAMPc e IL-4 em diferentes concentrações. Nesses ensaios foi possível verificar a atividade máxima de ARG1 com 1 mM BrAMPc e 5 ng/mL de IL-4 (Figura 6).

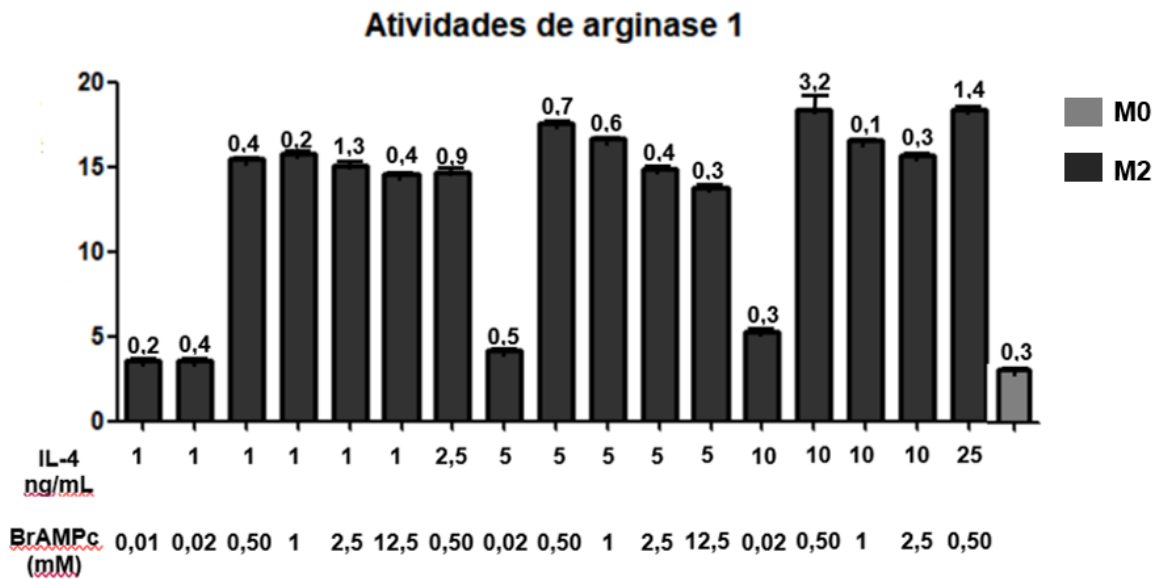


Figura 6. Diferentes atividades de arginase 1 de macrófagos M0 (residente) e M2 (nmol urea.µg ptr⁻¹.10min⁻¹) após ativação com diferentes concentrações de 8-Bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate (BrAMPc) e Interleucina-4 (IL-4) por 24h. Foi realizado o cálculo de Média e Desvio padrão dos experimentos.

5.2. Microscopia óptica de campo claro

Após determinar a ativação que gerou o máximo de atividade de ARG1 em MØs RAW 264.7 M2, foram realizados ensaios de infecção com *T. gondii* nesses MØs para verificar o desenvolvimento do parasito. Após 2, 24 e 48 h de infecção utilizando a atividade máxima de MØ M2, tanto os MØs M0 como os M2 infectados com *T. gondii* apresentaram quantidade similar de taquizoítos nos VPs (Figura 7 A e B).

MØs M0 apresentaram taquizoítos dentro do VP, sendo possível visualizar a sua multiplicação (Figura 7 C). Entretanto, MØs M0 tratados com inibidor de ARG1 apresentaram menos taquizoítos por VP, em 24 h (Figura 7 E). O mesmo padrão se repetiu para MØs M2 sem e com inibidor de ARG1 em 24 h (Figura 7 D e F), respectivamente. Observou-se redução da divisão de taquizoítos quando inibidor de ARG1 foi utilizado.

Macrófagos M0 apresentaram em 48 h a formação de rosáceas dentro do VP (Figura 7 G). MØs M2 apresentaram a formação de grande rosácea (Figura 7 H). Tanto em MØs M0 e M2, há uma redução de taquizoítos por VP com a utilização do inibidor de ARG1 (Figura 7 I e J), respectivamente.

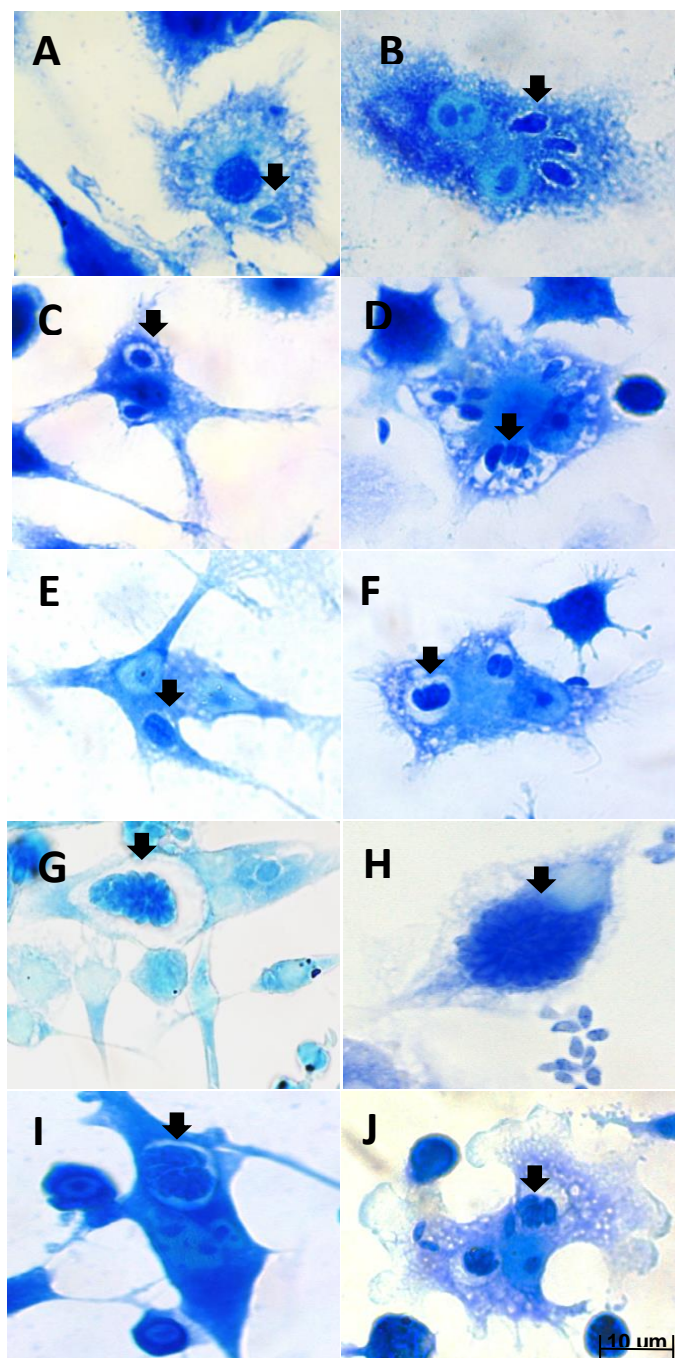


Figura 7. Microscopia óptica de campo claro de macrófagos (MØs) RAW 264.7, M0 e ativados M2 infectados por *Toxoplasma gondii*, cepa RH, por 2, 24 e 48 horas, tratados ou não com Nor-NOHA (inibidor de ARG1 - 100µM) corados com Giemsa. MØs M0 infectados por 2 h, taquizoítos podem ser visualizados (A) (seta). MØs ativados M2 infectados por 2 h, taquizoítos podem ser visualizados (B) (seta). MØs M0 e ativados M2 infectados por 24 h, taquizoítos podem ser visualizados (C e D) (setas). MØs M0 e ativados M2 infectados e tratados com inibidor de ARG1 por 24 h, taquizoítos podem ser visualizados (E e F) (setas). MØs M0 e ativados M2 infectados por 48 h, taquizoítos podem ser visualizados formando rosácea (G e H) (setas). MØs M0 e ativados M2 infectados tratados com inibidor de ARG1 por 48 h, taquizoítos podem ser visualizados, com formação de rosácea menores (I e J) (setas), respectivamente. Barra =10µm.

5.3. Avaliação do crescimento de *Toxoplasma gondii* em macrófagos RAW

264.7 M0 e M2

Após 2 h de infecção MØs M0 e M2 apresentaram valores similares de porcentagem de MØs infectados com *T. gondii* (% INF) (Figura 8 A), número médio de taquizoíta por vacúolo parasitóforo (número médio taqui/ VP) (Figura 8 B) e índice de infecção (Figura 8 C).

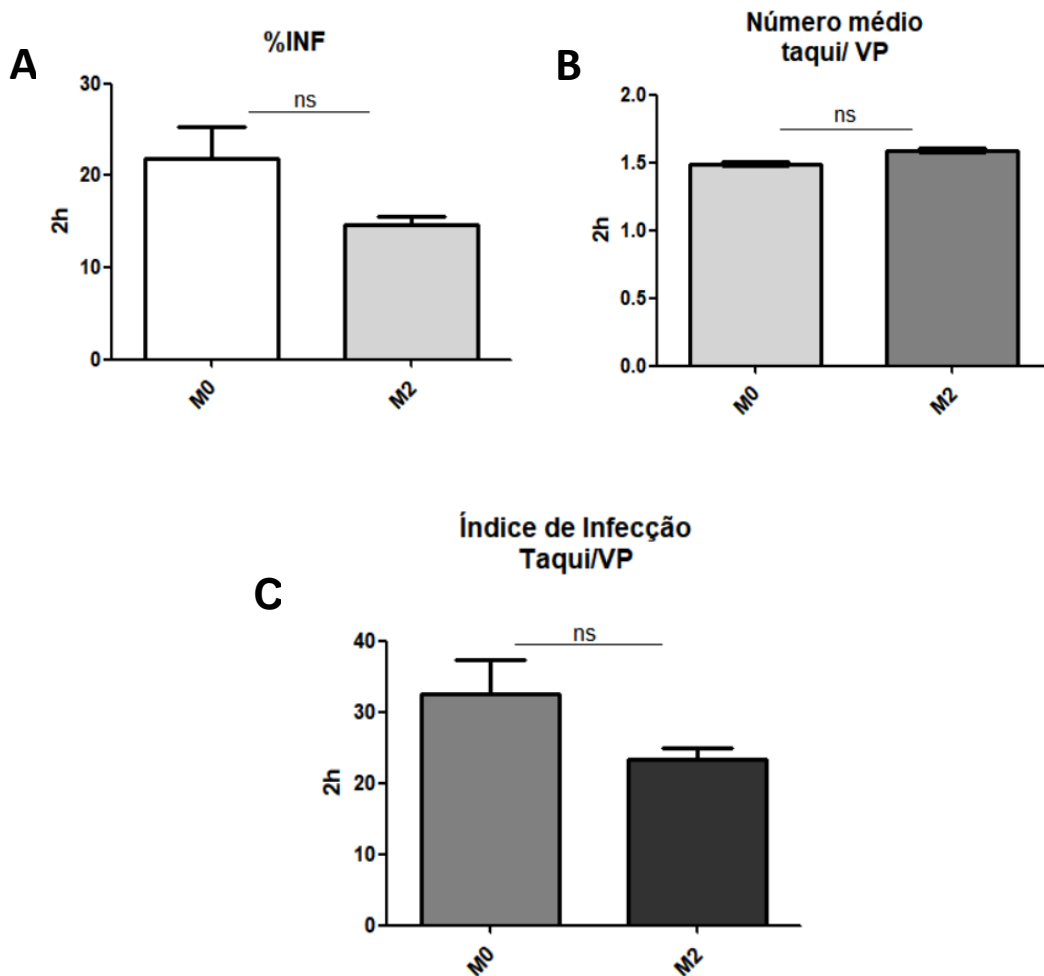


Figura 8. Desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em macrófagos (MØs) RAW 264.7 M0 e ativados M2 infectados por 2 h. MØs foram contados e calculado a porcentagem de MØs infectados com *Toxoplasma gondii* (% INF - A), número médio de taquizoíta por vacúolo parasitóforo (número médio taqui/ VP - B) e índice de infecção (Índice de infecção taqui/VP - C). Contagem de 100 MØs por lamínula para cálculo de Média e Desvio padrão de 3 experimentos diferentes em quadruplicada. NS= não significativo, pelo *Unpaired t test*.

Macrófagos infectados com *T. gondii* no perfil M0 e ativados M2 tratados ou não com inibidor de ARG1 em 24 e 48 h foram quantificados. A porcentagem de

MØs infectados com *T. gondii*, em M0 e M2, apresentou redução quando tratados em 24 h; no entanto, em 48 h valores foram similares (Figura 9 A e B). O número médio de taquizoítos por VP em MØs M0 não demonstrou diferença com e sem inibidor em 24 e 48 h (Figura 9 C). Entretanto, no MØs M2 detectamos diminuição do crescimento de taquizoítos por VP, com a utilização de inibidor de ARG1 em 24 e 48 h (Figura 9 D). O índice de infecção em MØs M0 não apresentou diferença nos tempos de 24 e 48 h (Figura 9 E). No MØs M2 houve diminuição do índice de infecção com o tratamento com o inibidor em 24 e 48 h (Figura 9 F).

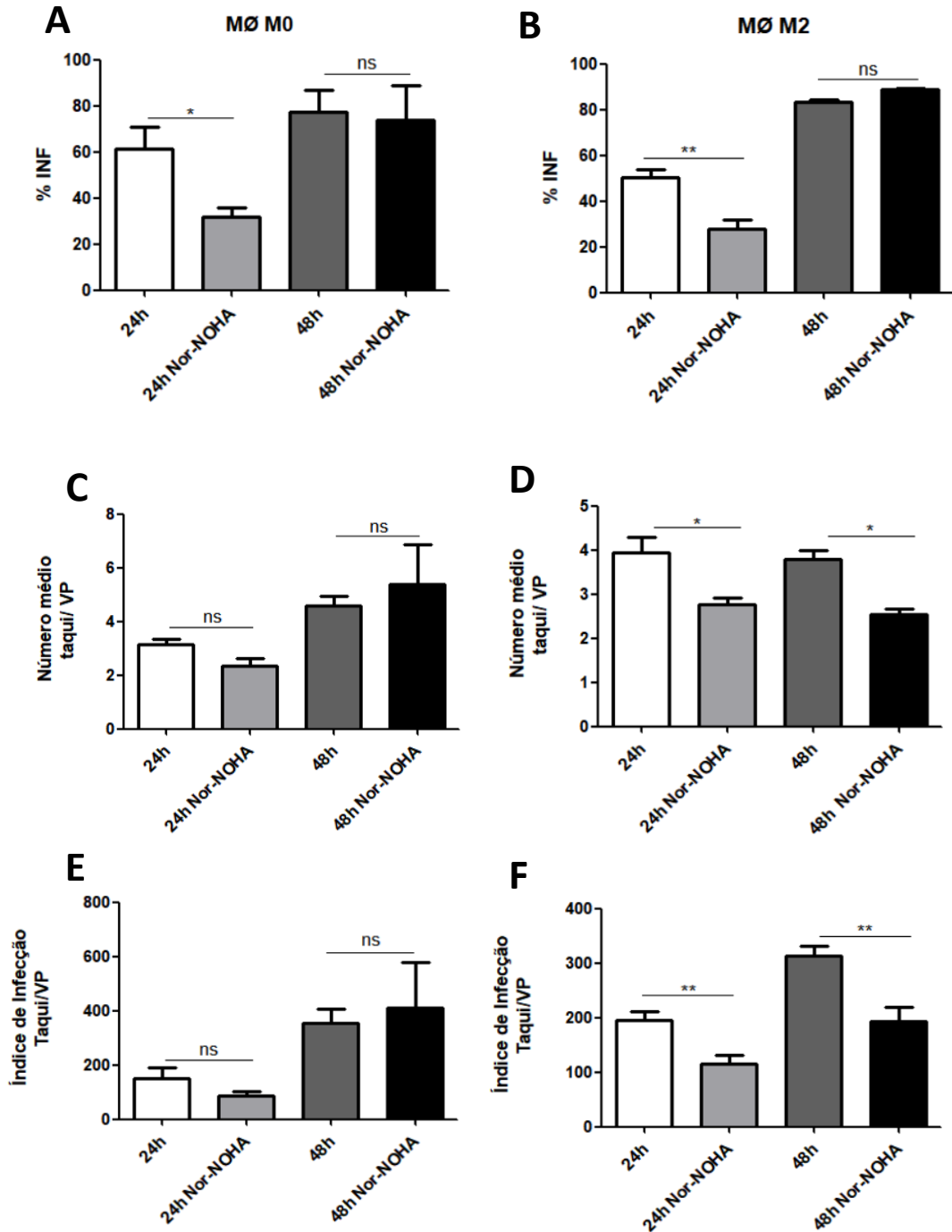


Figura 9. Desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em macrófagos (MØs) RAW 264.7 M0 e ativados M2 infectados por 24 h e 48 h. MØs foram contados e calculado a porcentagem de MØs infectados com *Toxoplasma gondii* (% INF – A e B), número médio de taquizoito por vacúolo parasitóforo (número médio taqui/VP – C e D) e índice de infecção (índice de infecção taqui/VP – E e F). Contagem de 100 MØs por lamínula para cálculo de Média e Desvio padrão de 3 experimentos diferentes em duplicata. **p < 0,01; *p < 0,05; ns= não significativo, pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.4. Avaliação Ultraestrutural (MET)

Foi observado nos MØs M2 sem e com inibidor respectivamente, que os taquizoítos dentro do VP apresentaram um padrão de encistamento com o surgimento de grânulos de amilopectina (Figura 10 A e B). Nota-se o aparecimento de *cleft* de membrana nos MØs M2 sem e com inibidor de ARG 1, respectivamente (Figura 10 C e D). MØs M2 sem inibidor apresentaram o complexo intramembranar da rede intravacuolar íntegro e homogêneo (Figura 10 E). No entanto, MØs M2 com inibidor apresentaram destruição do complexo intramembranar da rede intravacuolar (Figura 10 F).

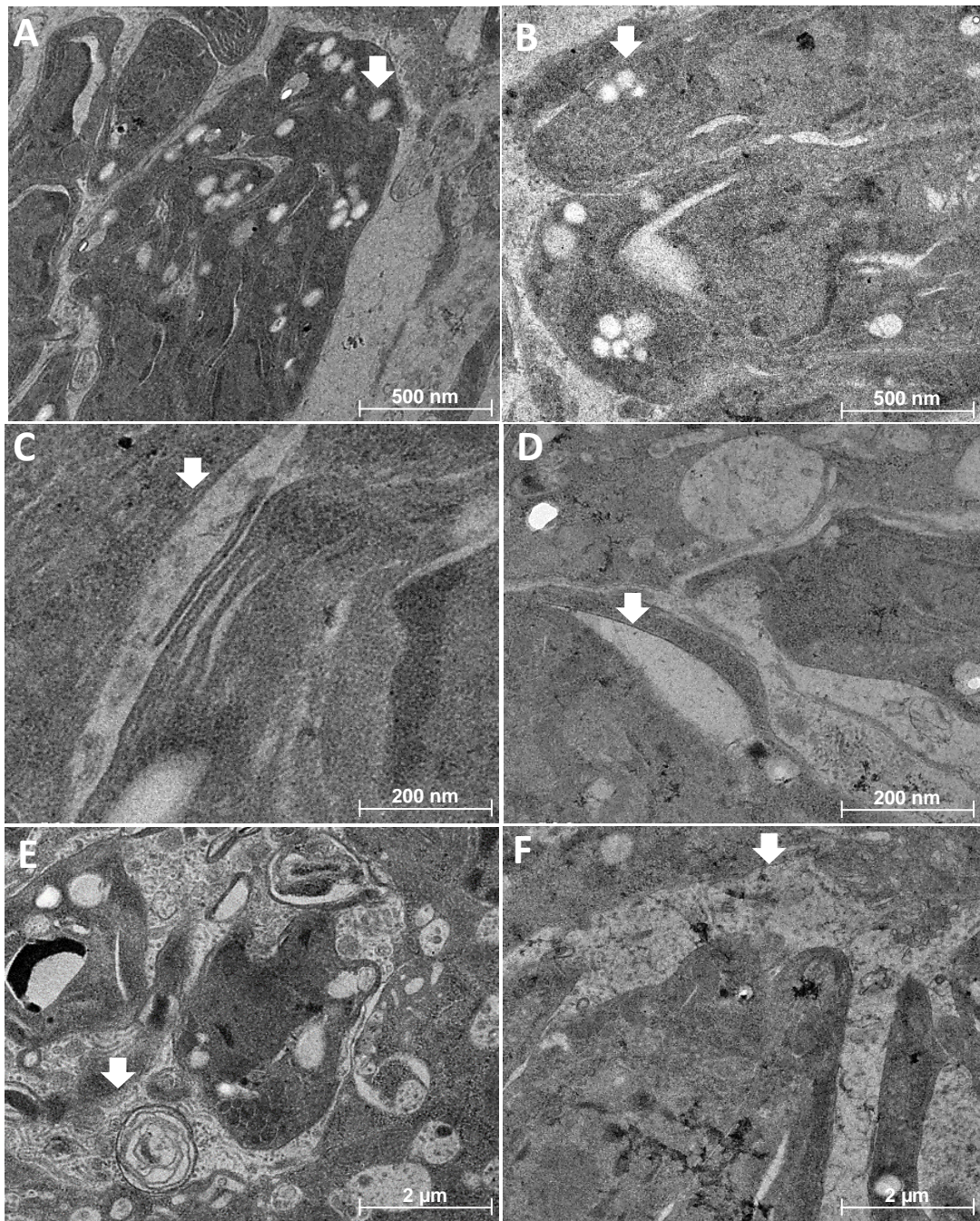


Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos (MØs) RAW 264.7 ativados M2 por 24 h, tratados ou não com Nor-NOHA (inibidor de ARG1). MØs M2 não tratados com inibidor de ARG1 (A, C e E) cultivados por 24 h. MØs M2 tratados com Nor-NOHA (100µM) (B, D e F) por 24 h. Nota-se em MØs M2 com e sem inibidor um padrão de encistamento (aparecimento de grânulos de amilopectina, setas em A e B) e *cleft* de membrana (setas em C e D). Rede intravacuolar íntegra em MØs M2 sem inibidor (seta em E) em relação a rede intravacuolar degradada do MØs M2 com inibidor (seta em F). Barras: 200 nm, 500 nm, 2 µm.

5.5. Avaliação da expressão de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 M0 e M2

Para investigar se as diferenças nos níveis de atividade são devidas a distinta expressão de ARG1, os níveis de proteína foram avaliados por *Western blotting*. A análise de *Western blotting* indica maior expressão de ARG 1 em MØs M2 em relação a MØs M0 (Figura 11 A e B).

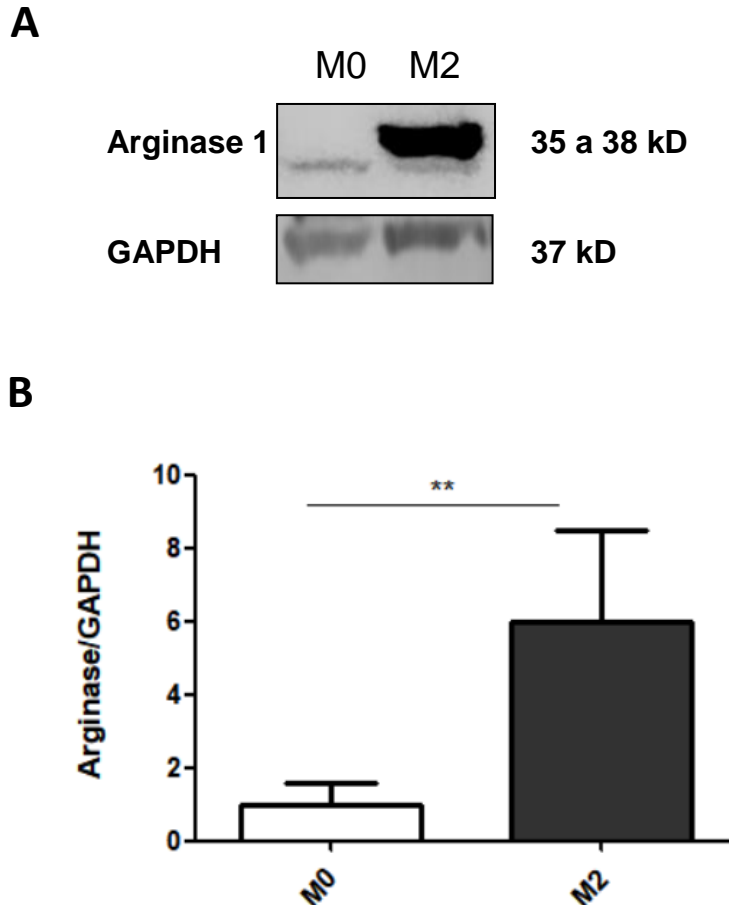


Figura 11. *Western blotting* da expressão de ARG1 de macrófagos (MØs) RAW 264.7 M0 e ativados M2. A expressão de ARG1 é maior em MØs M2; GAPDH é o controle de carregamento (A). Quantificação pela técnica de *Western blotting* da expressão de ARG1 de MØs M0 e ativado M2 (B). Média e desvio padrão de 3 experimentos diferentes. **p < 0,01, pelo *Unpaired t test*.

5.6. Avaliação da localização de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 M0 e M2

Para avaliar a localização de ARG1 foi realizado marcações da enzima por imunofluorescência em MØs M0 e ativados M2 em 24 h. Entretanto, não obtivemos marcações com a concentração de anticorpo primário anti-ARG1 utilizado.

6. DISCUSSÃO

Toxoplasma gondii é capaz de modular positivamente MØs M1 para M2, através da liberação de fatores de virulência (Jensen *et al.*, 2011). Essa mudança macrofágica fenotípica pode ser benéfica para *T. gondii*, pois há a expressão de ARG1 e consequente aumento de poliaminas que podem auxiliam no processo de endodiogenia e sobrevivência do parasito dentro da célula (Jensen *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2007; De Souza *et al.*, 2010). Para entender melhor se o aumento da expressão de ARG1 causada pela infecção do parasito altera a sobrevivência e permanência no MØ analisamos a progressão da atividade de ARG1 com concentrações crescentes de BrAMPc e IL-4, na qual foi verificado a concentração máxima em 1 mM BrAMPc e 5 ng/mL de IL-4. Avaliamos o desenvolvimento de *T. gondii* em 2 h e não houve diferença de infecção de M0 para M2. No entanto, em 24 h e 48 h houve redução de *T. gondii* no VP com a utilização do inibidor específico de ARG1. Foi analisada a ultraestrutura de *T. gondii* em MØs M2 tratado e não tratado com inibidor de ARG1, sendo possível notar alteração ultraestrutural no parasito em MØs M2 com e sem inibidor de ARG1. Observamos por *western blotting* que nos MØs M2 há uma expressão superior de ARG1 em relação a M0. A marcação por imunofluorescência para ARG1 não funcionou com a concentração de anticorpo testado. Por fim, vimos que a ARG1 influencia positivamente o desenvolvimento e manutenção *T. gondii* intracelularmente.

Foi utilizado concentrações crescentes de BrAMPc e IL-4 em MØs ativados M2. Morris e colaboradores (1998) descreveram a capacidade do BrAMPc de induzir a expressão de mRNA de ARG1 na linhagem RAW 264.7. Ademais, a IL-4 induz ligação dos fatores de transcrição STAT6 e C/EBPb ao promotor da arginase 1 em MØs RAW 264.7. A combinação de BrAMPc e IL-4 exógeno, induzem fortemente e sinergicamente a ligação de STAT6 e C/EBPb ao promotor da arginase 1; o BrAMPc atua nesse contexto amplificando o sinal de IL-4 (Morris *et al.*, 1998; Sheldon *et al.*, 2013). Nos ensaios enzimáticos foi possível observar aumento exponencial, à medida que aumentamos as concentrações dos ativadores. Observamos também o início do ponto máximo de produção enzimática, na qual houve pouca oscilação da atividade de ARG1 a partir de 0,50 mM BrAMPc e 1 ng/mL de IL-4 até 2,5 mM BrAMPc e 10 ng/mL de IL-4. Esses dados, confirmam o que Sheldon e colaboradores (2013) descreveram da atuação sinérgica do BrAMPc diante de IL-4,

pois foi visto que à medida que aumentamos a concentração de BrAMPc, o MØ apresentou maior ativação M2 e consequente expressão de ARG1. Com esses resultados, foi definido a concentração de 1 mM BrAMPc e 5 ng/mL de IL-4, como ideal para a ativação de MØs M2 com alta atividade de ARG1 e uso subsequente para testes de desenvolvimento de *T. gondii*. Os MØs M0 apresentaram baixa atividade de ARG1 confirmando a literatura (Gomez Perdiguero *et al.*, 2015; Sorokin *et al.*, 1992). Portanto, estabelecemos as concentrações de ativadores para obter MØs M2 com alta atividade de ARG1 para comparar o desenvolvimento de *T. gondii* com MØs M0.

Toxoplasma gondii consegue induzir a expressão de ARG1 em MØs infectados, por meio da fosforilação de STAT3 e STAT6, sendo um mecanismo de evasão da resposta inflamatória da célula (Butcher *et al.*, 2011). No entanto, o efeito direto de ARG1 no desenvolvimento de *T. gondii* é desconhecido. Para tal, infectamos MØs M0 e M2 com *T. gondii* e avaliamos a porcentagem de infecção, número médio de taquizoíto por VP e índice de infecção em 2 h. Nesse período, não foi visto diferença no desenvolvimento e crescimento de *T. gondii* nos MØs M0 e M2 (Figura 8 A, B e C). Isso pode ser explicado, pois o processo de divisão de *T. gondii* dentro do VP inicia-se entre 6-8 horas (*in vitro*) (Goldman *et al.*, 1958). Em 2 h, *T. gondii* penetra se estabelece dentro da célula hospedeira e inicia-se o processo de divisão que vai gerar o ciclo lítico (Black & Boothroyd, 2000; Carruthers & Boothroyd, 2007).

Analisamos o desenvolvimento de *T. gondii* com a utilização do inibidor de ARG1 em MØs M0 e M2. Em 24h, obtivemos em ambos os MØs um decréscimo no número de células infectadas com a utilização do inibidor, já em 48 h não houve diferença na porcentagem de MØs infectados (Figura 9 A e B). Em 24 e 48h, foi observado também em MØs M2 uma redução de taquizoíto por VP e do índice de infecção utilizando o inibidor (Figura 9 D e F). Com uso do inibidor foi possível visualizar a diminuição no tamanho das rosáceas, formato característico de *T. gondii* replicado num ambiente de alta infecção (Figura 7 I e J). Zhang e colaboradores (2023), observaram que tratando células HSCs com Nor-NOHA e arginina, houve redução na proliferação de células HSCs, demonstrando possivelmente a capacidade desse inibidor em atuar na cascata das poliaminas. Com esses dados, acreditamos que a ARG1 é decisória na manutenção e infecção de novas células por *T. gondii*. No entanto, a ARG1 não é a única proteína a ser implicada, há outras

vias que podem ser importantes nesse processo. Cook e colaboradores (2007) descreveram a necessidade das poliaminas sintetizadas pela célula hospedeira para o crescimento de *T. gondii*. Seabra e colaboradores (2004) relataram que a via da ODC é importante para o desenvolvimento de *T. gondii*, pois com o uso do inibidor específico da via da ODC, o índice de infecção de *T. gondii* foi reduzido. Dessa forma, nossos resultados sugerem que ARG1 de MØs M2 possivelmente possui um papel essencial no crescimento, desenvolvimento e permanência de *T. gondii* intracelularmente.

Foi realizada a avaliação ultraestrutural de MØs M2 infectados com *T. gondii* sem ou com tratamento do Nor-NOHA em 24 h. Foi possível observar o surgimento de grânulos de amilopectina o que é característico da conversão do estágio taquizoíta para bradizoíta (Figura 10 A e B) (Attias *et al.*, 2014). Portes e colaboradores (2018) descreveram o efeito citostático de um metalocomplexo e sulfadiazina (SDZ) no crescimento de *T. gondii*, causando o processo de encistamento com o aparecimento de grânulos de amilopectina. O mesmo pode ser observado com a utilização de Nor-NOHA no nosso estudo. No entanto, surpreendentemente em MØs M2 não tratados foi visto a mesma característica de surgimento de cistos teciduais. Isso possivelmente pode ser explicado, pois o processo de conversão em bradizoíta é um mecanismo de sobrevivência de *T. gondii* induzido por estresse, envolvendo diversos fatores como: oscilações de temperatura, mudança de pH, diminuição de nutrientes e resposta pró-inflamatória (Weiss *et al.*, 1995; Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2005; Eaton *et al.*, 2006). Isso sugere que os MØs M2 possam ter gerado um estresse celular como alteração de pH da célula ou consumo de arginina. Outro ponto, a ser considerado é que possivelmente com aumento enzimático e liberação de poliaminas, houve um crescimento exacerbado de *T. gondii* e ao mesmo tempo possa ser que a célula não possui condições energéticas e nutritivas suficientes para a manutenção de *T. gondii*, levando estrategicamente a sua conversão de estágio.

No MØs M2 sem e com tratamento foi visto *cleft* de membrana possivelmente no RE (Figura 10 C e D). O RE tem como principal função a síntese e transporte de proteínas, metabolismo de carboidratos e armazenamento de cálcio (Schwarze & Blower, 2016). A PVM de *T. gondii*, tem a capacidade de comunicar com organelas da célula hospedeira, como as mitocôndrias e o RE (De Souza, 2005). Essa associação permite a passagem de fosfolipídeos que podem aumentar o PV,

auxiliando no processo de endodiogenia de *T. gondii* (Sinai & Joiner, 2001; Martin *et al.*, 2007). É provável que o *cleft* de membrana tenha ocorrido devido ao estresse do RE, diante do aumento enzimático em conjunto com a infecção. Ocorrendo assim a destruição do lúmen do RE, prejudicando o processamento, transporte de proteínas e o metabolismo de cálcio. Esse estresse pode ocorrer devido a diminuição energética e nutricional da célula, mutações genéticas, utilização de fármacos ou infecção (Cui *et al.*, 2023; Marciniak *et al.*, 2022). Portanto, os resultados apresentados aqui sugerem que MØs M2 podem gerar estresse em *T. gondii*. No entanto, essa possibilidade necessita de novos estudos.

Foi possível notar em MØs M2 não tratados com Nor-NOHA uma rede intravacuolar íntegra no VP, em relação ao tratado no qual essa rede estava destruída (Figura 10 E e F). A rede intravacuolar é composta por nanotubos lipídicos provenientes da célula hospedeira que se associam as proteínas efetoras presentes na PVM de *T. gondii*, formando poros que permitem a passagem de solutos e moléculas de até 1300Da do citoplasma da célula hospedeira para o VP, sendo essencial para o metabolismo e manutenção de *T. gondii* (Zhao *et al.*, 2023; De Souza *et al.*, 2010; Schwab *et al.*, 1994). É possível que o tratamento com inibidor aja causando um desequilíbrio da associação do citoplasma com o VP, provavelmente impedindo a passagem de moléculas como as poliaminas. Portes e colaboradores (2018) observaram que no tratamento com SDZ em células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii*, ocasionou o desequilíbrio e ruptura da rede intravacuolar. Com isso, podemos concluir que com o uso de Nor-NOHA possivelmente reduziu metabólitos e moléculas essenciais para a manutenção de *T. gondii*. O tratamento pode ter levado ao estresse oxidativo celular, que levou a alteração da morfologia celular do parasito, e conseqüentemente a destruição da rede intravacuolar no VP.

Observamos por *western blotting* que MØs M2 com alta atividade de ARG1 apresentam íntima ligação com maior expressão de ARG1 em relação aos MØs M0 (Figura 11 A e B). MØs M2 são comumente ativados por fatores anti-inflamatórios como a IL-4. Liu e colaboradores (2021) descreveram a ARG1 e CD206 (receptor 1 de manose) como marcadores de MØs M2. Analisaram por *western blotting* e qPCR MØs RAW 264.7 tratados com IL-4, mostrando o aumento da expressão de ARG1, CD206 e STAT6. Indicando que a fosforilação de STAT6 esteja ligada a ativação de MØs M2 induzida pela IL-4. Sendo assim, com a alta atividade de ARG1 proveniente

pela adição de IL-4 e BrAMPc exógeno, há provavelmente uma maior fosforilação de STAT6 levando a maior expressão de ARG1 em MØs M2, como observamos nos ensaios por *western blotting*.

A localização de ARG1, foi avaliada através de marcações de imunofluorescência em MØs M0 e ativados M2 em 24 h. Surpreendentemente, obtivemos resultado negativo. Não observamos marcações com o uso da diluição de 1:100 de anticorpo primário anti-ARG1. Acreditamos que é necessário utilizar uma concentração maior para as marcações para imunofluorescência de ARG1, pois no *western blotting* conseguimos marcações melhores com a uma diluição maior (1:300) de anticorpo primário anti-ARG1 ao invés de 1:500 que testamos. Nossos estudos serão realizados para se tentar localizar a ARG1 nos MØs M0 e M2 infectados com o parasito.

7. CONCLUSÃO

Ao utilizar concentrações crescentes de BrAMPc e IL-4, houve ativação de MØs M2 com alta atividade e expressão de ARG1. O estudo da interação MØ/parasito mostrou decréscimo no desenvolvimento de taquizoítos de *T. gondii* após inibição de ARG1 com Nor-NOHA indicando que a ARG1 modula positivamente o crescimento e manutenção de *T. gondii*.

Ao analisar a ultraestrutura do parasito em MØs M2 com e sem inibidor de ARG1, foi possível visualizar que essa relação pode ocasionar alterações na morfologia celular, e no tratado com inibidor de ARG1 pode levar a ruptura da rede intramembranar. Isso sugere que MØs M2 podem gerar estresse em *T. gondii*, levando a conversão de taquizoíto em bradizoíto. Entretanto é necessário a continuidade das análises da interação MØ M2 e *T. gondii* para melhor entender esse paradigma.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, A.A. *et al.* (2019). The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. **EcoHealth**. vol.16, p. 378-390.
- Ash, D. E. (2004). Structure and function of arginases. **The Journal of nutrition**, vol. 134, n. 10, p. 2760S-2764S.
- Attias, M. *et al.* (2014). A Organização Estrutural de *Toxoplasma gondii*. In: Souza, W; Belfort JR. R. Comp. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora **Fiocruz**. p. 47-60.
- Attias, M; Souza, W. (2021). Chapter 2: Ultrastructure of Tachyzoite, Sporozoite and Bradyzoite forms. In: Duarte, E.S.M; Adesse, D. *Toxoplasma Gondii* Prevalence and role in health and disease. Rio de Janeiro: **Nova Science Publishers, Inc**, p.23-40.
- Baneth, G., *et al.* (2015). Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe. **Science Direct**. 155: S54-S74.
- Barbosa, H.S. *et al.* (2014). O Ciclo Evolutivo. In: Souza, W; Belfort, JR.R. Comp. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora **Fiocruz**. p. 33- 45.
- Bierly, A.L. *et al.* (2008). Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. **J Immunol** 181(12): 8485-8491.
- Biswas, S. K., *et al.* (2012). "Macrophage polarization and plasticity in health and disease." **Immunol Res**. 53(1-3): 11-24.
- Biswas, S. K., *et al.* (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. **Immunol Res**, 53(1-3): 11-24.
- Black, M.W; Boothroyd, JC. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Mol Biol Rev**. 64, 607-623.
- Brown A.K., *et al.* (2014). Opposing microtubule motors control motility, morphology and cargo segregation during ER-to-Golgi transport. **Biol Open**. 3: 307-13.
- Butcher, B.A. *et al.* (2011). *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLOS Pathog**. vol. 7(9).
- Cabral, G. R. A., *et al.* (2018). Inhibition of Nitric Oxide Production in Activated Macrophages Caused by *Toxoplasma gondii* Infection Occurs by Distinct Mechanisms in Different Mouse Macrophage Cell Lines. **Front Microbiol** 9: 1936.
- Carruthers, V; Boothroyd, J. C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current opinion in microbiology**, vol. 10, n. 1, p. 83-89.
- Christianson, D. W. (2005). Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. **Accounts of chemical research**, vol. 38, n. 3, p. 191-201.
- Cook, T. *et al.* (2007). Divergent polyamine metabolism in the Apicomplexa. **Microbiology (Reading)**.153(Pt 4):1123-1130.
- Coppin, A., *et al.* (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. **Biochimie**, 85: 353-361.

- Corraliza I.M. *et al.* (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J Immunol Methods**. vol. 174(1-2), p. 231-5.
- Courret, N. *et al.* (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood** 107(1): 309- 316.
- Cui, Y., *et al.* (2023). Melatonin Engineering M2 Macrophage-Derived Exosomes Mediate Endoplasmic Reticulum Stress and Immune Reprogramming for Periodontitis Therapy. **Advanced Science**, vol. 10, n. 27, p. 2302029.
- Da Gama L. M. *et al.* (2004). Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and *in vivo* migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.** 6(14):1287-96.
- Dahdah A., *et al.* (2014). Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. **J Clin Invest** 124 (10): 4577-89.
- Davies L. C., *et al.* (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. **Nat Commun** 4: 1886.
- De Souza W. (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. **Histochem Cell Biol.**123:1-18.
- De Souza, W., *et al.* (2010). Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Sci Med.** 20 (1):131-143.
- Djurković-djaković, O., *et al.* (2005). Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. **Microbes and infection**, vol. 7, n. 1, p. 49-54.
- Eaton, M. S., *et al.* (2006). Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite–bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, vol. 36, n. 1, p. 107-114.
- El Kasmi, K. C. *et al.* (2008). Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. **Nat Immunol.** vol. 9 (12), p. 1399-1406.
- Flegr, J. *et al.* (2014). Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **Plos One.** vol .9 (3).
- Fouce, R. B. *et al.* (2012). Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Elsevier.** vol. 181 (2), p. 85-93.
- Fox, A.B. *et al.* (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **Int J Parasitol.**
- Genard, G., *et al.* (2017). Reprogramming of tumor-associated macrophages with anticancer therapies: radiotherapy versus chemo-and immunotherapies. **Frontiers in immunology**, 8, 276127.
- Goldman, M. *et al.* (1958). Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. **J Parasitol** 44(2): 161-171.
- Gomez Perdiguero, E., *et al.* (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature.** 518(7540): 547-551.
- Gonçalo, S. C. *et al.* (2020). Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective. **Int. J. Mol Sci.** vol. 21, 5291.

- Gordon, S; Pluddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. **BMC Biol** 15(1): 53.
- Hakimi, M.A., *et al.* (2017). Toxoplasma Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. **Clin Microbiol Rev.** (3):615-645.
- Heinrich, F. *et al.* (2017). Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages *in vitro*. **Plos one**.
- Howe, D.K; Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis.** 172(6):1561-6.
- Hunter, C.A; Sibley, D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol** 10, 766–778.
- Ivanenkov, Y. A., Chufarova, N. V. (2014). Small-molecule arginase inhibitors. **Pharmaceutical Patent Analyst**, 3(1), 65–85.
- Jensen, K. D. *et al.* (2011). Toxoplasma polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. **Cell Host Microbe.** vol. 9(6), p. 472-83.
- Kasal, A.B. *et al.* (2018). Research proposal: inflammation and oxidative stress in coronary artery bypass surgery graft: comparison between diabetic and non-diabetic patients. **BMC Research Notes.** 11,635.
- Kochanowsky, J.A. *et al.* (2021). ROP16-Mediated Activation of STAT6 Suppresses Host Cell Reactive Oxygen Species Production, Facilitating Type III *Toxoplasma gondii* Growth and Survival. **mBio** 12(2).
- Lavin, Y.*et al.* (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell.** vol 159(6), p.1312-1326.
- Liu, L., *et al.* (2021). The role of C/EBP homologous protein (CHOP) in regulating macrophage polarization in RAW264. 7 cells. **Microbiology and Immunology**, vol. 65, n. 12, p. 531-541.
- Maldonado, Y. A. *et al.* (2017). Diagnosis, Treatment, and Prevention of Congenital Toxoplasmosis in the United States. **American Academy of Pediatrics.** vol. 139 (2).
- Marciniak, S. J., *et al.* (2022). Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 21, n. 2, p. 115-140.
- Martin, A.M., *et al.* (2007). The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. **J Eukaryot Microbiol.** 54:25-28.
- Mercier, C. *et al.* (2005). Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **Int J Parasitol.** vol.35, p. 829-849.
- Mills, C. D. (2012). M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Crit Rev Immunol.** vol. 32, p. 463-488.
- Moghaddam, A. S., *et al.* (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol.** 233 (9).
- Morris, S.M. *et al.* (1998). Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. **The American Physiological Society.** 0193-1849.
- Okabe Y., R. Medzhitov (2014). Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. **Cell** 157 (4): 832-44.
- Pegg A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life.** vol. 61(9), p. 880-894.

- Portes, J. A., *et al.* (2018). A new iron (III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, vol. 117, p. 2795-2805.
- Rocha, S. M., *et al.* (2023). In vitro anti-Leishmania activity of new isomeric cobalt (II) complexes and in silico insights: Mitochondria impairment and apoptosis-like cell death of the parasite. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 240, p. 112088.
- Saeij, J. P. *et al.* (2007) *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**. vol. 445(7125), p. 324-327.
- Scallan, E. *et al.* (2011). "Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens." **Emerg Infect Dis**. vol. 17(1), p. 7-15.
- Schwab, J. C., *et al.* (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 91, n. 2, p. 509-513.
- Schwarz, D. S.; BLOWER, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and molecular life sciences**, vol. 73, p. 79-94.
- Seabra, S. H. *et al.* (2002). *Toxoplasma gondii* Partially Inhibits Nitric Oxide Production of Activated Murine Macrophages. **Elsevier**. vol. 100, p.62-70.
- Seabra, S. H. *et al.* (2004). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophages evasion. **Biochem Biophys Res Commun**. vol. 324, p. 744-752.
- Sheldon, K. E., *et al.* (2013). Shaping the Murine Macrophage Phenotype:IL-4 and Cyclic AMP Synergistically Activate the Arginase I Promoter. **J. Immunol**. 191:2290-2298.
- Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. **Traffic**. 4(9): 581-586.
- Sinai, A.P; Joiner K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Biol**. 154:95-108.
- Smith, N. C., *et al.* (2021). Control of human toxoplasmosis. **Int J Parasitol**. 51(2-3):95-121.
- Sorokin, S. P., *et al.* (1992). Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. **Anat Rec**. 232(4): 527-550.
- Stanic, Z; Fures, R. (2020). Toxoplasmosis: a global zoonosis. **Veterinaria**. vol. 69 (1).
- Tangsudjai S., M., *et al.* (2010). Involvement of the MyD88-independent pathway in controlling the intracellular fate of *Burkholderia pseudomallei* infection in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. **Microbiol Immunol** 54(5):282-90.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., Weiss, L. M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animal to humans. **Int J Parasitol**. 30, 1217-1258.
- Walker, M. E., *et al.* (2008). *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. **Elsevier**. vol.10 (14-15), p.1440-1449.
- Wang, C., *et al.* (2021). Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. **Front Immunol**. 12: 803037.

- Weiss, L. M., *et al.* (1995). A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, vol. 42, n. 2, p. 150-157.
- Weiss, L. M; Kim, K. (2011). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. Perspectives and methods. **Elsevier**.
- Wu Y., *et al.* (2018). Effects of FM0807, a novel curcumin derivative, on lipopolysaccharide-induced inflammatory factor release via the ROS/JNK/p53 pathway in RAW264.7 cells. **Biosci Rep** 17;38(5). pii: BSR20180849.
- Wu, G; Morris, JR. S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, vol. 336, n. 1, p. 1-17.
- Yunna, C., *et al.* (2020). Macrophage M1/M2 polarization. **Elsevier**. 877.
- Zhang, M., *et al.* (2023). Arginase 1 expression is increased during hepatic stellate cell activation and facilitates collagen synthesis. **Journal of Cellular Biochemistry**.
- Zhao, X.Y., *et al.* (2023). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is necessary for GBP-mediated *T. gondii* restriction in murine macrophages via vacuole nitration and intravacuolar network collapse. **bioRxiv**.