

ATIVIDADE DE ECTOATPASES EM SUBPOPULAÇÕES DE
FOSFATIDILSERINA DE *Toxoplasma gondii* E SEU EFEITO NA
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS MURINOS
ATIVADOS

FERNANDA SILVA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO/2018

ATIVIDADE DE ECTOATPASES EM SUBPOPULAÇÕES DE
FOSFATIDILSERINA DE *Toxoplasma gondii* E SEU EFEITO NA
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS MURINOS
ATIVADOS

FERNANDA SILVA DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO/2018

ATIVIDADE DE ECTOATPASES EM SUBPOPULAÇÕES DE
FOSFATIDILSERINA DE *Toxoplasma gondii* E SEU EFEITO NA
INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM
MACRÓFAGOS MURINOS ATIVADOS

FERNANDA SILVA DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Examinada em 28 de fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Alba Lucínia Peixoto Rangel – LBR/UENF

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro – LBR/UENF

Prof.^a Dr.^a Suzana Passos Chaves – UFRJ/Macaé

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta – LBCT/UENF

(Orientador)

*Dedico este trabalho a Deus... Nenhuma palavra poderia expressar
tamanha gratidão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada por este amor imenso que tens mim, amor este tão grande que me permitiu viver coisas grandes e incrivelmente desafiadoras. Obrigada por me capacitar, fornecer apoio acima do meu merecimento e 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 professor Renato Augusto DaMatta. Acima de tudo obrigada pela amizade, confiança e respeito. A experiência de participar de seu grupo de pesquisa jamais será esquecida. Sou grata pelas oportunidades que me deu ao longo desses anos. Espero que permaneças sempre assim, um exemplo de profissional dedicado apesar das adversidades que a ciência brasileira vem enfrentando. E agora, chegando na reta final e seguindo meu caminho, sei que ainda teremos muitos desafios pela frente e desejo sorte para nós dois!

Ao Instituto de Bioquímica médica e Biofísica da UFRJ, em especial a aluna Nathália Rocco e aos professores José Roberto Meyer, Wanderley de Souza e Rossiane Vommaro pela disponibilidade e ajuda na etapa de quantificação ectoATPásica.

Ao professor Sérgio Seabra, obrigada pela disponibilidade e presteza.

Aos professores doutores Alba Rangel, Suzana Chaves e Milton Kanashiro, pelas contribuições ao longo da minha jornada e/ou por terem aceitado fazer parte da banca examinadora.

A minha amiga Barbarella Macchi, conhecer você foi uma das coisas mais inesperadas e gratificante que me acontecera. Apesar da distância, sei que estaremos unidas para toda vida. Você é uma mulher batalhadora e inteligente em um nível extraordinário. Obrigada pelos ensinamentos, pela revisão e suplência neste trabalho.

Ao Gabriel Rabello, um amigo irmão! Obrigada por me proporcionar momentos de muita alegria com suas manias e simplicidade. Sei que nossa amizade vai além dos muros da UENF e desejo um futuro brilhante, pois você não merece menos do que isso.

Ao Thiago Torres, isso pode parecer estranho, mas obrigada pelas conversas descontraídas, brincadeiras e convívio agradável. Sua timidez esconde um coração imenso e fico feliz por tê-lo conhecido de verdade. Apesar de não admitir sei que vai sentir minha falta... mas tente não chorar em público!

Ao Joaquim Xavier, obrigada por esse humor fantástico que sempre alegrava meu dia. Você é um jovem cheio de coragem e iniciativa, não perca essa essência. Muito sucesso em sua caminhada!

A Natália Almeida. Espero ter contribuído de forma positiva para sua formação. Sei que tens muitos sonhos e desejo sucesso na sua jornada.

A Letícia Oliveira, Júlia Resende, Josiana Gomes, Tâmara Ribeiro, Viviane Campos, Teresa Pontes, Bruna da Silva, Juliana Azevedo e Matheus de Freitas pelo carinho imenso, abraços acolhedores e as boas risadas que os tornaram especiais em minha vida.

Aos técnicos do LBCT pelos ensinamentos e carinho.

As minhas amigas e irmãs que constituíram a minha família em Campos: Marcela Possoly e Luana Carvalho. 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 todas as bênçãos de Deus. Amo vocês!

Ao meu amigo João Cláudio de Sá. Agradeço por todos os ensinamentos e alegria incontestável que me fez, e ainda faz, sorrir até em momentos de tristeza. Nossa amizade é para a vida!

A minha amiga Luciana Lemos. No nosso caso segue o ditado que os opostos se atraem, pois mesmo com personalidades totalmente diferentes conseguimos cultivar uma amizade sincera e divertida. Você é uma pessoa de personalidade forte e coração imenso.

Aos amigos maravilhosos e engraçados que fiz ao longo desses 10 anos. Muitos que seguindo seu caminho já foram para longe, mas jamais deixarão meu coração.

Aos meus amados 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 e poder cuidar de vocês, mas sei que desejam o melhor para mim e isso requer alguns sacrifícios.

A minha irmã, confidente e melhor amiga, Danielle Silva. Obrigada também ao meu cunhado, Bruno Santos, pelo carinho e as orações. Agradeço a Deus por tê-los ao meu lado. Amo vocês!

E por fim, mas não menos importante, a UENF. Uma instituição com ensino, pesquisa e professores de qualidade que lutam com coragem a favor da educação. Obrigada por me acolher nesses 10 anos!

Durante essa jornada... Convivi com a distância.

Descobri que paciência requer prática... E flexibilidade não é sinônimo de fraqueza ou falta de personalidade.

Percebi que as dificuldades nunca acabam... E que são elas, que no fim, nos fazem crescer...

Entendi que o hoje é essencial para se fazer algo realmente relevante.

Reconheci que as pessoas que escolhemos para estar ao nosso lado nos influenciam, mas tudo o que fizermos será de nossa responsabilidade...

Aprendi que realmente posso suportar... Que realmente sou forte e posso ir mais longe do que esperava.

Fernanda Silva de Souza

RESUMO

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose. Entre seus “mecanismos de evasão”, está a capacidade de inibir a produção do agente microbicida óxido nítrico (NO) em macrófagos. A inibição ocorre pela liberação do fator de crescimento transformante-beta1 e migração nuclear do fator de transcrição Smad2P que inibe a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Sabe-se que parte dos taquizoítos de *T. gondii* expõe fosfatidilserina (PS) na membrana externa mimetizando apoptose. A subpopulação PS⁺ tem maior capacidade de invasão e inibição de NO, ao contrário da subpopulação PS⁻. Ecto-ATPases, são enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares (efeito pró-inflamatório) em nucleosídeos (efeito anti-inflamatório). Em *T. gondii* estas enzimas foram identificadas nos grânulos densos para síntese de nucleotídeos. Entretanto, pouco se sabe sobre sua atuação nos mecanismos de evasão do parasito. Com base nisso, objetivou-se quantificar a atividade ecto-ATPásica nas subpopulações PS de *T. gondii* e seu efeito na produção de NO em macrófagos murinos ativados classicamente. A quantificação ecto-ATPásica foi realizada em subpopulações de PS isoladas, tratadas ou não com inibidores desta enzima (DIDS e suramina). Macrófagos foram infectados com as subpopulações PS tratadas ou não com DIDS. NO foi dosado e macrófagos imunomarcados para iNOS e Smad2P. A subpopulação PS⁺ demonstrou 6 vezes mais atividade ecto-ATPásica do que a subpopulação PS⁻. DIDS teve maior eficiência na inibição. Infecção com subpopulação PS⁺ inibiu a produção de NO com baixo percentual de macrófagos positivos para iNOS e alta marcação para Smad2P. O tratamento de PS⁺ com DIDS reverteu a inibição com elevada marcação para iNOS e redução no Smad2P nuclear, assemelhando-se a subpopulação PS⁻. Estes resultados indicam que as ecto-ATPases de superfície em *T. gondii* podem funcionar como mecanismo de evasão à produção de NO de macrófagos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Subpopulações. Ecto-ATPases. Óxido nítrico. Fosfatidilserina.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is the etiological agent of toxoplasmosis. Among the “evasion mechanisms” is the ability to inhibit the production of the microbicidal agent nitric oxide (NO) of macrophages. Inhibition occurs by release of transforming growth factor-beta1 and nuclear migration of the transcription factor Smad2P that inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS). It is known that part of the tachyzoites population of *T. gondii* exposes phosphatidylserine (PS) at the outer membrane mimicking an apoptotic cell. This PS⁺ subpopulation has greater capacity to invade and inhibit NO, unlike the subpopulation PS⁻. Ecto-ATPases, are enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides (pro-inflammatory effect) in nucleosides (anti-inflammatory effect). In *T. gondii* these enzymes were identified in the dense granules for nucleotide synthesis. However, little is known about its participation in parasite evasion mechanisms. Thus, the aim was to quantify the ecto-ATPase activity in the *T. gondii* PS subpopulations and its effect on NO production in classically activated murine macrophages. The ecto-ATPase activity was measured in the isolated PS subpopulations, treated or not with ecto-ATPase inhibitors (DIDS and suramina). Macrophages were infected with PS subpopulations treated or not with DIDS. NO was evaluated and macrophages immunolabelled for iNOS and Smad2P. The PS⁺ subpopulation demonstrated 6-fold more ecto-ATPase activity than the PS⁻ subpopulation. DIDS showed greater inhibition efficiency. Infection with PS⁺ subpopulation inhibited NO production with low percentage of iNOS positive macrophages and high labeling for Smad2P. Treatment of PS⁺ with DIDS reversed inhibition with high iNOS labeling and reduction in nuclear Smad2P, similar to the PS⁻ subpopulation. These results indicate that surface ecto-ATPases in *T. gondii* can function as a mechanism to avoid NO production of macrophages.

Key words: *Toxoplasma gondii*. Subpopulations. Ecto-ATPases. Nitric oxide. Phosphatidylserine.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Pág.
Figura 1 – Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> infectando macrófagos murinos ativados.....	3
Figura 2 – Representação esquemática de um taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> com a indicação de organelas típicas de células eucarióticas e outras exclusivas desse filo.....	4
Figura 3 – Tipos de multiplicação assexuada em Apicomplexas. Esquizogonia, endodiogenia e endopoligenia.....	6
Figura 4 – Esquema do ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 5 – Representação de macrófagos infectados com subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Figura 6 – Esquema demonstrativo de citocinas produzidas por células imunes determinando perfis de macrófagos classicamente ativados, reparadores ou regulatórios.....	13
Figura 7 – Estrutura de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina.....	16
Figura 8 – Sinalização purinérgica e resposta imune.....	21
Figura 9 – Atividade ectoATPásica de subpopulação de <i>Toxoplasma gondii</i> que expõe (PS ⁺) ou não (PS ⁻) a fosfatidilserina.....	30
Figura 10 – Atividade ectoATPásica de subpopulação de <i>Toxoplasma gondii</i> que expõe (PS ⁺) (A) ou não expõe (PS ⁻) (B) a fosfatidilserina, na presença ou ausência de inibidores da atividade ectoATPásica DIDS ou Suramina (Sur).....	31
Figura 11 – Produção de nitrito por macrófagos murinos ativados após 24 h (A) ou 48 h (B) de infecção com população total de <i>Toxoplasma gondii</i> (PS ^{+/-}), subpopulação que expõe fosfatidilserina (PS ⁺), subpopulação que não expõe (PS ⁻) e subpopulações tratadas com 0,5 mM do inibidor da atividade ectoATPásica DIDS (PS ⁺ DIDS / PS ⁻ DIDS).....	33
Figura 12 – Imagens representativas de macrófagos (núcleo marcado por DAPI - azul) negativos ou positivos para iNOS (verde) infectados com subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i> (vermelho) por 24 h.....	34

Figura 13 – Média do percentual de macrófagos murinos ativados e infectados, positivos ou negativos para iNOS após 2 h (A), 24 h (B) ou 48 h (C) de interação com população total de <i>Toxoplasma gondii</i> (PS ^{+/-}), subpopulação que expõe fosfatidilserina (PS ⁺), subpopulação que não expõe fosfatidilserina (PS ⁻), e subpopulações tratadas com inibidor da atividade ectoATPásica, DIDS (PS ⁺ DIDS / PS ⁻ DIDS).....	35
Figura 14 – Imagens representativas de macrófagos positivos ou negativos para Smad2P (verde) infectados com subpopulação PS ⁺ de <i>Toxoplasma gondii</i> (vermelho) por 24 h.....	36
Figura 15 – Média do percentual de macrófagos murinos ativados, infectados e positivos para Smad2P após 24 h (A) ou 48 h (B) de infecção com população total de <i>Toxoplasma gondii</i> (PS ^{+/-}), subpopulação que expõe fosfatidilserina (PS ⁺), subpopulação que não expõe fosfatidilserina (PS ⁻), e subpopulações tratadas com inibidor da atividade ectoATPásica, DIDS (PS ⁺ DIDS / PS ⁻ DIDS).....	37
Figura 16 – Média do percentual de macrófagos murinos ativados, não infectados e positivos para Smad2P após 24 h ou 48 h de infecção com população total de <i>Toxoplasma gondii</i> (PS ^{+/-}), subpopulação que expõe fosfatidilserina (PS ⁺), subpopulação que não expõe fosfatidilserina (PS ⁻), e subpopulações tratadas com inibidor da atividade ectoATPásica DIDS (PS ⁺ DIDS / PS ⁻ DIDS).....	38
Tabela 1 – Soroprevalência humana da toxoplasmose em diferentes países.....	5

LISTA DE ABREVIATURAS

Ado	Adenosina
ADP	Adenosina-5`-Difosfato
AMP	Adenosina-5`-monofosfato
AMPC	Adenosina 3',5`-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina-5`-trifosfato
CD 73/ 5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
CDs	Células dendríticas
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DIDS	4,4*-diisothiocyanostylbene 2*,2*-disulfonic acid
E-NTPDases	Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolases
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
IFN-γ	Interferon gamma
IκB	Inibidor de K _b
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
PBS	Tampão fosfato salino
Pi	Fosfato inorgânico
PS	Fosfatidilserina
PS⁻	Parasitas que não expõem fosfatidilserina
PS⁺	Parasitas que expõem fosfatidilserina
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Sinal de transdução e fator de transcrição
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta 1
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
VP	Vacúolo parasitóforo

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de figuras e tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xii
1 Introdução.....	1
2 Revisão de literatura.....	2
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	2
2.2 Epidemiologia e ciclo de vida.....	5
2.3 Mecanismos de invasão celular e evasão do sistema imune.....	8
2.4 Macrófagos.....	11
2.5 Óxido nítrico sintase induzida e óxido nítrico.....	13
2.6 Receptores purinérgicos, nucleotídeos e nucleosídeos de adenina....	15
2.7 Sinalização purinérgica e resposta imune.....	17
2.8 Ectonucleotidases.....	19
2.9 Ectonucleotidases e parasitos.....	21
3 Objetivos.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 Materiais e métodos	26
4.1 Células hospedeiras.....	26
4.2 Separação das subpopulações de taquizoítos PS ⁺ e PS ⁻ de <i>T. gondii</i> .	26
4.3 Quantificação de atividade ectoATPásica.....	27
4.4 Inibição de ectoATPase e interação com células hospedeiras.....	28
4.5 Dosagem de NO.....	28
4.6 Imunomarcção de iNOS e Smad2P.....	28
4.7 Análise dos dados.....	29
5 Resultados	30
5.1 Atividade ectoATPásica em subpopulações de PS de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
5.2 Efeito dos inibidores DIDS e Suramina na atividade ectoATPásica de subpopulações de PS de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
5.3 Produção de nitrito de macrófagos ativados e infectados com subpopulações de PS de <i>Toxoplasma gondii</i> tratadas ou não com os inibidores DIDS e Suramina.....	32
5.4 Imunomarcção da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida em macrófagos ativados e infectados com subpopulações PS de <i>Toxoplasma gondii</i>	34
5.5 Localização de Smad2 fosforilada em macrófagos ativados e infectados com subpopulações PS de <i>Toxoplasma gondii</i>	36
6 Discussão.....	39
7 Conclusões.....	44
8 Referências Bibliográficas.....	45

1 1 Introdução

2

3 *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, agente
4 etiológico da toxoplasmose (Dubey e Beattie, 1988). Em humanos a
5 toxoplasmose é uma das infecções mais recorrentes (Cenci-Goga *et al.*, 2011).
6 *Toxoplasma gondii* apresenta três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e
7 esporozoítos. A primeira forma é capaz de ocasionar danos teciduais pela alta
8 capacidade de replicação que causa lise celular (Dubey *et al.*, 1998).

9 *Toxoplasma gondii* tem um processo de invasão e sobrevivência
10 eficiente, isso se deve, em parte, pelos diversos mecanismos evasivos capazes
11 de superar as defesas imunes do hospedeiro (Lang *et al.*, 2007). Dentre os
12 mecanismos de evasão descritos está a capacidade deste parasito em inibir a
13 produção do agente microbicida óxido nítrico (NO) em macrófagos (Seabra *et*
14 *al.*, 2002; Lüder *et al.*, 2003; Seabra *et al.*, 2004) através da exposição do
15 fosfolípido fosfatidilserina (PS) realizando um “mimetismo apoptótico” (Seabra
16 *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*, 2011). Em 2011 as subpopulações de *T. gondii*
17 foram separadas obtendo-se a subpopulação que expõe PS (PS⁺) e a
18 subpopulação que não expõe (PS⁻). A subpopulação PS⁺ é mais eficiente na
19 invasão, além de inibir a produção de NO nos macrófagos ativados (Dos
20 Santos *et al.*, 2011). Dessa forma, as duas subpopulações apresentam papéis
21 distintos na infecção.

22 O processo inflamatório e rompimento de células durante a infecção e/ou
23 algumas patologias induzem a liberação de nucleotídeos no ambiente
24 extracelular. Estes acentuam a resposta inflamatória induzindo produção de
25 citocinas pró-inflamatórias via sinalização purinérgica (Bours *et al.*, 2006). A
26 inflamação exacerbada, por esse mecanismo, é regulada por enzimas
27 denominadas ectonucleotidases, localizadas na membrana plasmática das
28 células com o sítio catalítico extracelular, que convertem nucleotídeos em
29 nucleosídeos (Zimmermann, 2001). Os nucleosídeos gerados no espaço
30 externo induzem um perfil anti-inflamatório essencial para a homeostase (Bours
31 *et al.*, 2006).

32 Pesquisas têm descrito a atividade de ectonucleotidases em parasitos,
33 inclusive *T. gondii*, indicando em muitos casos sua associação com virulência e
34 evasão ao sistema imune hospedeiro, por exploração da via de inativação

1 induzida por nucleosídeos (Vasconcelos *et al.*, 1993; Asai *et al.*, 1995; Barros
2 *et al.*, 2000; Berredo-Pinho *et al.*, 2001, Kikuchi *et al.*, 2001; Bisaggio *et al.*,
3 2003; Meyer- Fernandes *et al.*, 2004; Marques-da-Silva *et al.*, 2008; Sansom *et*
4 *al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2015). Neste trabalho as ectonucleotidasas foram
5 investigadas como um possível mecanismo de evasão adicional utilizado por
6 subpopulações PS de *T. gondii* para burlar a defesa microbica de macrófagos
7 ativados. Compreender os diversos mecanismos de evasão utilizados por *T.*
8 *gondii* para estabelecer a infecção, bem como a correlação entre eles, é
9 essencial para o desenvolvimento de estratégias de combate ao parasito.

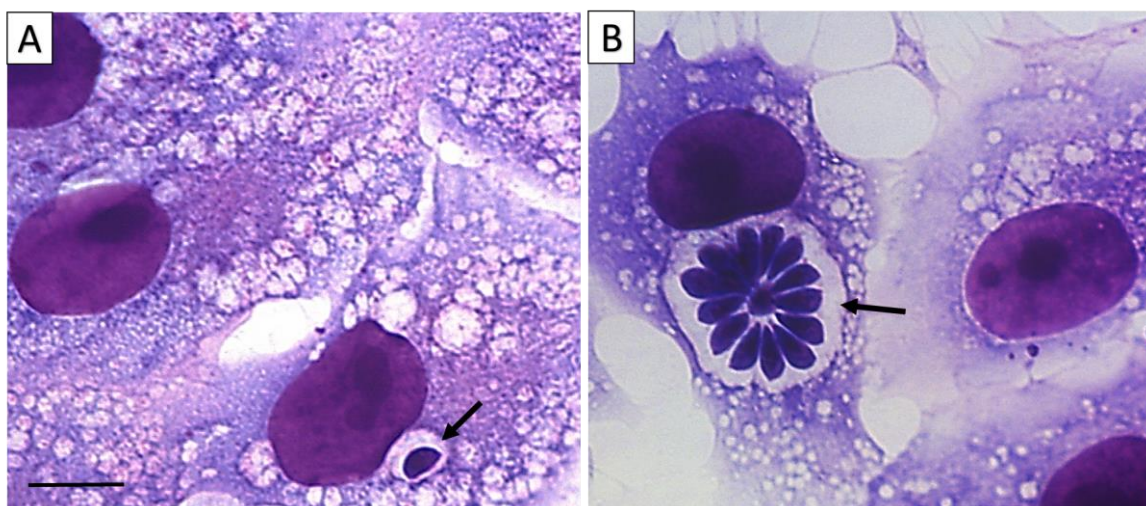
11 **2 Revisão de literatura**

13 2.1 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

15 *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório (Dubey e
16 Beattie, 1988) descrito simultaneamente em 1908 por Splendore (Splendore,
17 1908) e Nicolle e Manceaux (Nicolle e Manceaux, 1908). O gênero *Toxoplasma*
18 faz referência ao formato arqueado do corpo deste protozoário e o epíteto
19 específico, *gondii*, faz menção ao roedor *Ctenodactylus gundi*, do qual o
20 parasito foi isolado na África (Nicolle e Manceaux, 1908; Dubey, 2008).

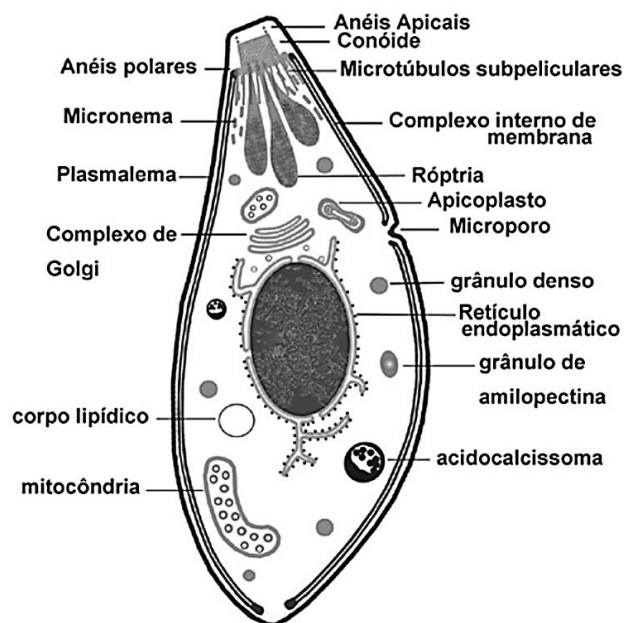
21 A espécie *T. gondii* pertence ao domínio Eukarya, reino Alveolata, filo
22 Apicomplexa, classe Coccidia, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae e
23 gênero *Toxoplasma* (NCBI, 2017). Este parasito possui três formas infectantes:
24 taquizoítos (forma de rápida multiplicação em células hospedeiras), bradizoítos
25 (presentes em cistos teciduais, com lenta multiplicação) e esporozoítos
26 (presentes dentro de oocistos liberados nas fezes de hospedeiros definitivos -
27 os felinos) (Miller *et al.*, 1972).

28 Pela alta capacidade de divisão, os taquizoítos promovem rápida
29 destruição tecidual. Apresentam 2-7 µm, com região posterior mais
30 arredondada em relação à anterior (Ferguson e Dubremetz, 2007). Quando
31 dentro de células hospedeiras se desenvolve em vacúolos parasitóforos (VP)
32 (Figura 1A) formado pelo remodelamento da membrana hospedeira (Lang *et*
33 *al.*, 2007). A multiplicação de taquizoítos leva a formação de estruturas
34 conhecidas como rosáceas (Figura 1B).



1
2 Figura 1 – Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* infectando macrófagos murinos
3 ativados. (A) Macrófagos infectados por 2 h. Taquizoíto em vacúolo
4 parasitóforo (seta). (B) Macrófagos infectados por 24 h. Rosácea formada pela
5 multiplicação de taquizoítos (seta). Barra: 10 µm. Fonte: acervo pessoal
6

7 Como célula eucariótica, *T. gondii* possui organelas, como núcleo,
8 retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, mitocôndria (única,
9 longa e ramificada). Possui ainda outras estruturas características, incluindo
10 apicoplasto (para produção de ácido graxo), acidocalcissomos (reservatório de
11 íons), microporo, anéis apicais e polares, corpos lipídicos e rede de
12 microtúbulos subpeliculares (Dubey *et al.*, 1998; de Souza *et al.*, 2010) (Figura
13 2). Uma película, constituída por três membranas, recobre o corpo do parasito,
14 incluindo a membrana plasmática e o complexo interno de membrana.
15 *Toxoplasma gondii* é incluído no filo Apicomplexa por apresentar estrutura
16 apical importante para invasão, o conóide, que organiza os microtúbulos,
17 seguido de organelas secretoras características: micronemas, róptrias e
18 grânulos densos (Dubremetz e Ferguson, 2009). Os numerosos micronemas
19 possuem forma de bastão (Dubey *et al.*, 1998; Dubremetz e Ferguson, 2009).
20 As róptrias assemelham-se a bolsas achatadas com região mais larga (bulbo) e
21 outra estreita (pescoço) conectada ao conóide (Lemgruber *et al.*, 2011). Os
22 grânulos densos circulares estão espalhados próximos a membrana plasmática
23 do parasito (Dubremetz e Ferguson, 2009).



1
2 Figura 2 – Representação esquemática de um taquizoíta de *Toxoplasma gondii*
3 com a indicação de organelas típicas de células eucarióticas e outras
4 exclusivas desse filo. Fonte: Modificado de Souza *et al.* (2010a).
5

6 A toxoplasmose é uma das infecções mais comum em humanos (Cenci-
7 Goga *et al.*, 2011). Embora descrito em 1908, a infecção humana só foi
8 relatada três décadas após, pela autópsia de uma criança com sinais clínicos
9 de encefalomielite e coriorretinite (Wolf *et al.*, 1939). As principais rotas de
10 transmissão incluem a infecção oral e transmissão mãe - feto (congenita)
11 (Weinman e Chandler, 1954; Jacobs *et al.*, 1960; Bahia-Oliveira *et al.*, 2003;
12 Cenci-Goga *et al.*, 2011).

13 Em imunocompetentes a infecção geralmente é assintomática. Cerca de
14 20% deste grupo desenvolve sinais clínicos como: dor na cabeça, fraqueza,
15 mialgia, febre, retinocoroidite e linfadenopatia cervical (alteração em número,
16 tamanho ou consistência de linfonodos) (Weiss e Dubey, 2009). Os casos mais
17 graves da doença ocorrem em indivíduos imunocomprometidos e infectados
18 congenitalmente (Saadatnia e Golkar, 2012). Em portadores do HIV (Machala
19 *et al.*, 2015) ou indivíduos sob ação de terapias imunossupressivas (Botterel
20 *et al.*, 2002; Martina *et al.*, 2011) o perigo consiste em reconversão de bradizoítos
21 em taquizoítos pela deficiência da resposta imune celular, culminando em
22 reativação da fase aguda da doença (Machala *et al.*, 2015). A infecção
23 congênita normalmente acomete crianças com mães infectadas durante a
24 gestação, podendo resultar, para os nascidos, em retardo mental,

1 retinocoroidite, calcificação intracerebral, perda auditiva ou morte (Goldstein *et*
2 *al.*, 2008).

3

4 2.2 Epidemiologia e ciclo de vida

5

6 Este protozoário é capaz de parasitar todos os animais homeotérmicos,
7 sendo, portanto, distribuído mundialmente (Saadatnia e Golkar, 2012; Uttah *et*
8 *al.*, 2013). Estima-se que 35,0% da população mundial esteja infectada por *T.*
9 *gondii*. Entretanto, por ser uma doença negligenciada é difícil determinar com
10 precisão sua prevalência (Uttah *et al.*, 2013). A tabela 1 indica soroprevalência
11 para toxoplasmose reportada em diferentes países.

12

13 Tabela 1 – Soroprevalência humana da toxoplasmose em diferentes países.

14

País	Soroprevalência
Estados Unidos	73,0% (Lykins <i>et al.</i> , 2016)
México	62,6% (Caballero-Ortega <i>et al.</i> , 2012)
Brasil	56,0% (Dubey <i>et al.</i> , 2012)
Alemanha	55,0% (Wilking <i>et al.</i> , 2016)
Reino Unido	23,0% - 33,0% (Joynson, 1992)
Índia	24,3% (Dhumne <i>et al.</i> , 2007)
França	47,0% (Fromont <i>et al.</i> , 2009)
China	12,3% (Zhou <i>et al.</i> , 2011)

15

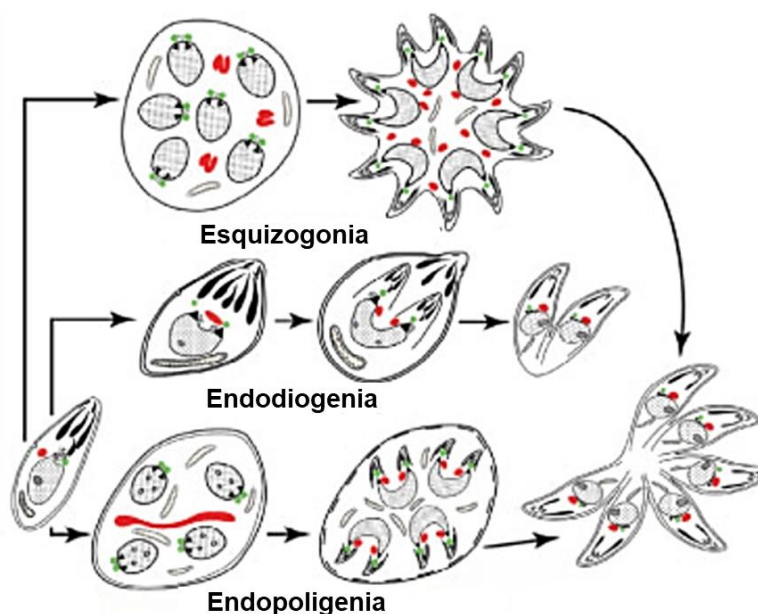
16 O ciclo de vida de *T. gondii* alterna entre as fases sexuada, que ocorre
17 em hospedeiros definitivos, e assexuada, em hospedeiros intermediários e
18 definitivos (Dubey, 2009). Em 1970, Frenkel e colaboradores identificaram
19 oocistos, característico da fase sexuada, em material fecal de gatos. Em 1972,
20 foi constatado que os oocistos são liberados exclusivamente por membros da
21 família Felidae (Frenkel *et al.*, 1970; Miller *et al.*, 1972).

22

23 A via oral é a principal rota de infecção nos felinos, onde os parasitos
24 invadem as células epiteliais intestinais conhecidas como enterócitos. Dentro
25 destas células ocorrem ciclos de multiplicação assexuada conhecida como
endodiogenia (a célula mãe origina duas células filhas internamente),

1 endopoligenia (endodiogenia múltipla) e esquizogonia (divisões nucleares
 2 seguida de fragmentação citoplasmática) (Ferguson *et al.*, 1974; Dubey, 1998;
 3 Dubey e Frenkel, 1972) (Figura 3). O ciclo de reinfecção é contínuo, com
 4 liberação de merozoítas, formados pelo processo de esquizogonia, e invasão
 5 de enterócitos. Posteriormente ocorre a formação de gametas masculinos
 6 flagelados e femininos imóveis; os gametas masculinos fecundam os femininos
 7 formando zigotos que originam oocistos não esporulados (Ferguson *et al.*,
 8 1974; Dubey, 2009). Enterócitos rompidos liberam os oocistos nas fezes de
 9 felinos ao longo de 1-2 semanas (Dubey *et al.*, 1970). A esporulação dos
 10 oocistos, com formação de 2 esporocistos, cada contendo 4 esporozoítos,
 11 ocorre sob condições ambientais tornando-os aptos a infectar outros
 12 hospedeiros (Miller *et al.*, 1972; Dubey, 1998; Hill e Dubey, 2002).

13

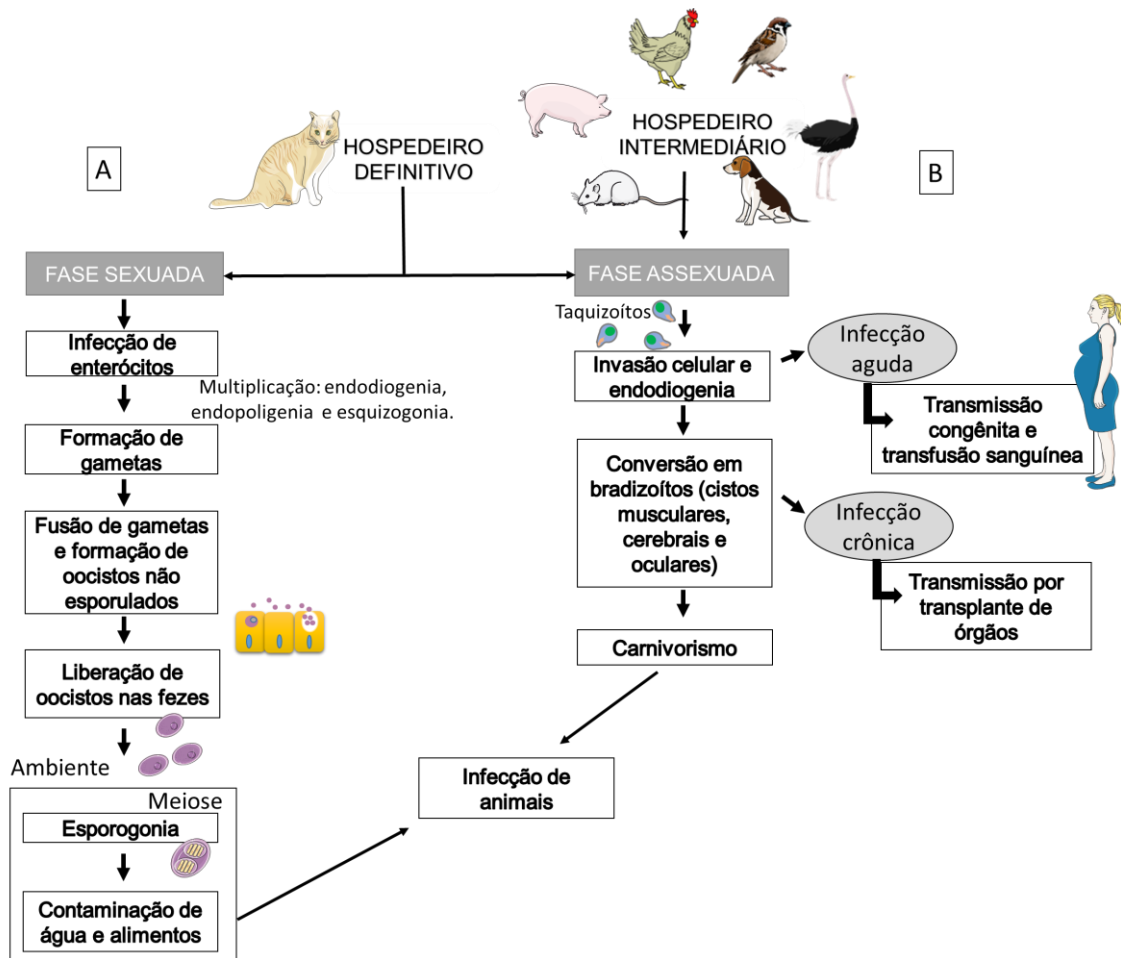


14

15 Figura 3 – Tipos de multiplicação assexuada em Apicomplexas. Esquizogonia,
 16 endodiogenia e endopoligenia. Fonte: Modificado de Ferguson *et al.* (2007).

17

18 Na fase assexuada, que pode ocorrer em hospedeiros definitivos ou
 19 intermediários, predomina a forma taquizoíto, nas infecções agudas, e
 20 bradizoíto, em infecções crônicas. Os bradizoítos formam cistos teciduais
 21 resistentes predominantemente localizados no sistema nervoso central e tecido
 22 muscular estriado, sendo estes, importantes fontes de disseminação pela via
 23 oral (Dubey, 2009). A figura 4 esquematiza o ciclo de vida.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Figura 4 – Esquema do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. (A) A fase sexuada ocorre apenas em felinos. Bradizoítos ou esporozoítos se multiplicam em enterócitos e diferenciam-se em gametas masculinos e femininos. Após a fusão de gametas os oocistos não esporulados são formados e com o rompimento dos enterócitos são eliminados nas fezes. A esporogonia ocorre no ambiente e oocistos maduros, com 2 esporocistos e 4 esporozoítos, tornam-se capazes de contaminar água e alimentos. (B) A fase assexuada pode ocorrer nos hospedeiros definitivos e intermediários. Na fase aguda da toxoplasmose, os taquizoítos invadem e se multiplicam rapidamente nas células. A lise de células infectadas libera taquizoítos. Pode ocorrer a transmissão congênita ou contaminação por transfusão sanguínea com a disseminação de taquizoítos. A fase crônica se inicia com a conversão de taquizoítos em bradizoítos que podem ser transmitidos por transplante de órgãos ou carnivorismo. Oocistos nas fezes de felinos ou cistos teciduais com bradizoítos podem infectar outros animais. As figuras foram obtidas no banco de imagens para apresentações científicas do Servier e através da página pngimg.com.

1 2.3 Mecanismos de invasão celular e evasão do sistema imune

2

3 *Toxoplasma gondii* é um parasito capaz de invadir e persistir em seus
4 hospedeiros com eficiência. O sucesso deste parasito está em sua capacidade
5 de lidar com o sistema imune hospedeiro burlando suas defesas (Lang *et al.*,
6 2007).

7 A ligação do complexo apical na membrana da célula hospedeira marca
8 o início do processo de invasão. A penetração ativa é essencial para a
9 sobrevivência do parasito e inibição das respostas imunes (Morisak *et al.*,
10 1995; Butcher e Denkers, 2002). Este evento dura cerca de 30 segundos
11 (Sibley e Andrews, 2000). Durante o processo de entrada ativa, a membrana
12 plasmática da célula hospedeira invagina-se e ocorre penetração do parasito
13 (Sibley, 1995; Toulah *et al.*, 2011), com liberação de proteínas presentes nos
14 micronemas e róptrias. Após a entrada, ocorre liberação do conteúdo dos
15 grânulos densos pelas regiões lateral e posterior do corpo do parasito
16 (Carruthers, 2002). Depois da invasão o parasito permanece dentro de um VP
17 que não se funde aos lisossomos, preservando sua integridade (Sibley *et al.*,
18 1985).

19 Em células epiteliais intestinais a infecção por *T. gondii* leva ao aumento
20 na expressão de quimiocinas inflamatórias como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2,
21 CXCL9 e CXCL10 (Gopal *et al.*, 2011). Estes fatores quimiotáticos atraem
22 células de defesa e facilitam a disseminação do parasito pelo sistema
23 hospedeiro (Da Gama *et al.*, 2004). Células dendríticas (CDs) infectadas são
24 capazes de migrar mais rápido, indicando que a mobilidade de células
25 hospedeiras também é aprimorada após infecção (Lambert *et al.*, 2006).

26 Como mecanismo de defesa, monócitos infectados liberam citocinas
27 para atrair neutrófilos e CDs. Estas células são importantes componentes da
28 resposta celular Th1 (Bliss *et al.*, 2001). As células *natural killer* (NK) produzem
29 interferon gamma (IFN- γ) em resposta a interleucina (IL)-12 liberada por
30 macrófagos e CDs (Gazzinelli *et al.*, 1993). Estudos relatam a importância do
31 IFN- γ para resistência da fase aguda e proteção na toxoplasmose cerebral
32 (Suzuki *et al.*, 1988; Sa *et al.*, 2015).

33 A resposta imune adquirida é mediada pela atuação de linfócitos CD4⁺ e
34 CD8⁺, através do reconhecimento de antígenos expostos por células

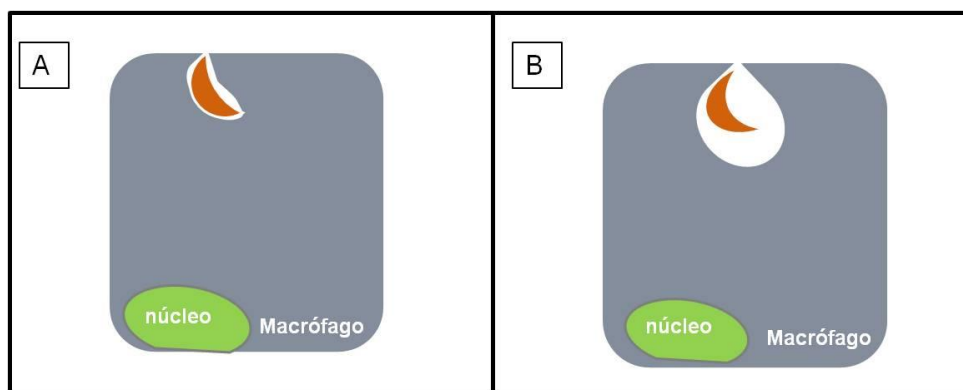
1 apresentadoras, via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I
2 (antígenos processados via proteossomo no citosol) ou classe II (fragmentos
3 oriundos de patógenos fagocitados e destruídos via lisossomos) (Denkers *et al.*,
4 1993; Denkers e Gazzinelli, 1998). Entretanto, por ser um parasito
5 intracelular obrigatório *T. gondii* obtém proteção contra o sistema humoral pela
6 sua localização intracelular (Lambert e Barragan, 2010).

7 A resposta inflamatória exagerada não é benéfica para sobrevivência do
8 hospedeiro e, conseqüentemente, do parasito. Nesse contexto, respostas de
9 caráter anti-inflamatório também são moduladas, uma vez que infecção por *T.*
10 *gondii* leva ao aumento na produção do fator de crescimento transformante
11 beta 1 (TGF- β 1) por macrófagos (Bermudez *et al.*, 1993; Seabra *et al.*, 2004). O
12 TGF- β 1 influencia negativamente o perfil microbicida de macrófagos reduzindo
13 os níveis de NO (Tsunawaki *et al.*, 1988).

14 Outra estratégia importante adotada por este parasito ocorre durante a
15 invasão da célula hospedeira, pois consegue mimetizar uma célula apoptótica
16 através da exposição de PS na monocamada externa de sua membrana
17 plasmática (Seabra *et al.*, 2004). A PS é um fosfolípido aniônico localizado na
18 monocamada interna da membrana da maioria das células não apoptóticas
19 (Vance e Steenberg, 2005). Quando na monocamada externa da membrana,
20 sinalizam apoptose, gerando resposta anti-inflamatória (Fadok *et al.*, 1998). A
21 exposição de PS na superfície externa da membrana de *T. gondii* induz
22 liberação de TGF- β 1 por macrófagos levando a redução do nível de NO
23 (Seabra *et al.*, 2004). Dos Santos e colaboradores (2011) isolaram as duas
24 subpopulações de PS em *T. gondii*. A subpopulação PS⁺ expõe PS na camada
25 externa da membrana e realiza o mimetismo apoptótico, enquanto que, a
26 subpopulação PS⁻ não apresenta tal característica. A análise dos vacúolos
27 formados após a invasão de células hospedeiras por estas subpopulações
28 revela que taquizoítos PS⁺ localizam-se em vacúolos estreitos, indicando
29 penetração ativa (Figura 5A). Em contraste, os taquizoítos da subpopulação
30 PS⁻ são retidos em vacúolos largos, indicativo de fagocitose (Figura 5B)
31 (Morisaki *et al.*, 1995; Dos Santos *et al.*, 2011). A subpopulação PS⁺ de *T.*
32 *gondii* é a única capaz de penetrar ativamente em células hospedeiras não
33 fagocíticas e inibir a produção de NO após infecção de macrófagos ativados.
34 Entretanto, a infecção *in vivo* com a população total (PS^{+/-}) promove maior

1 tempo de sobrevivência em camundongos que a infecção apenas com
 2 subpopulações isoladas. Infecção com taquizoítos PS⁺ desencadeia alta
 3 parasitemia identificada em amostras teciduais dos animais. Em contrapartida,
 4 taquizoítos PS⁻ induzem processo inflamatório exacerbado. Em ambos os
 5 casos há comprometimento da viabilidade dos camundongos (Dos Santos *et al.*, 2011).

7



8

9 Figura 5 – Representação de macrófagos infectados com subpopulações de
 10 *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítos PS⁺ em vacúolo estreito. (B) Taquizoítos
 11 PS⁻ em vacúolo largo. Fonte: Souza (2014).

12

13 Macrófagos infectados reduzem a produção de IL-12, IFN- γ e fator de
 14 necrose tumoral alfa (TNF- α) pela liberação de IL-10 e bloqueio da
 15 translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Lang *et al.*, 2007). O
 16 reconhecimento de IL-10 por seu receptor ativa Jak1 e Tyk2, culminando em
 17 fosforilação do sinal de transdução e fator de transcrição 3 (STAT3) (Hutchins
 18 *et al.*, 2013). STAT 3 regula negativamente genes envolvidos com citocinas
 19 inflamatórias (Darnell, 1997). Entretanto a ativação de STAT 3 pode ocorrer de
 20 forma independente da produção de IL-10 em macrófagos (Butcher *et al.*,
 21 2005). Cepas tipo I de *T. gondii* liberam o conteúdo das róprias, como a
 22 ROP16, capaz de fosforilar STAT 3 exercendo os mesmos efeitos (Butcher *et al.*
 23 *et al.*, 2016).

24

25 *Toxoplasma gondii* também induz bloqueio da translocação nuclear de
 26 NF- κ B. A infecção de macrófagos induz a fosforilação e degradação da
 27 molécula inibidora I κ B, entretanto, o NF- κ B de macrófagos ativados infectados
 28 por *T. gondii* não é translocado para o núcleo (Butcher *et al.*, 2001). Em adição,
 macrófagos ativados perdem o sinal de NF- κ B nuclear após infecção (Seabra

1 *et al.*, 2004).

2 A permanência de *T. gondii* na célula hospedeira significa sua
3 sobrevivência, sendo assim mecanismos de invasão e evasão eficientes são
4 primordiais para o sucesso da infecção.

5

6 2.4 Macrófagos

7

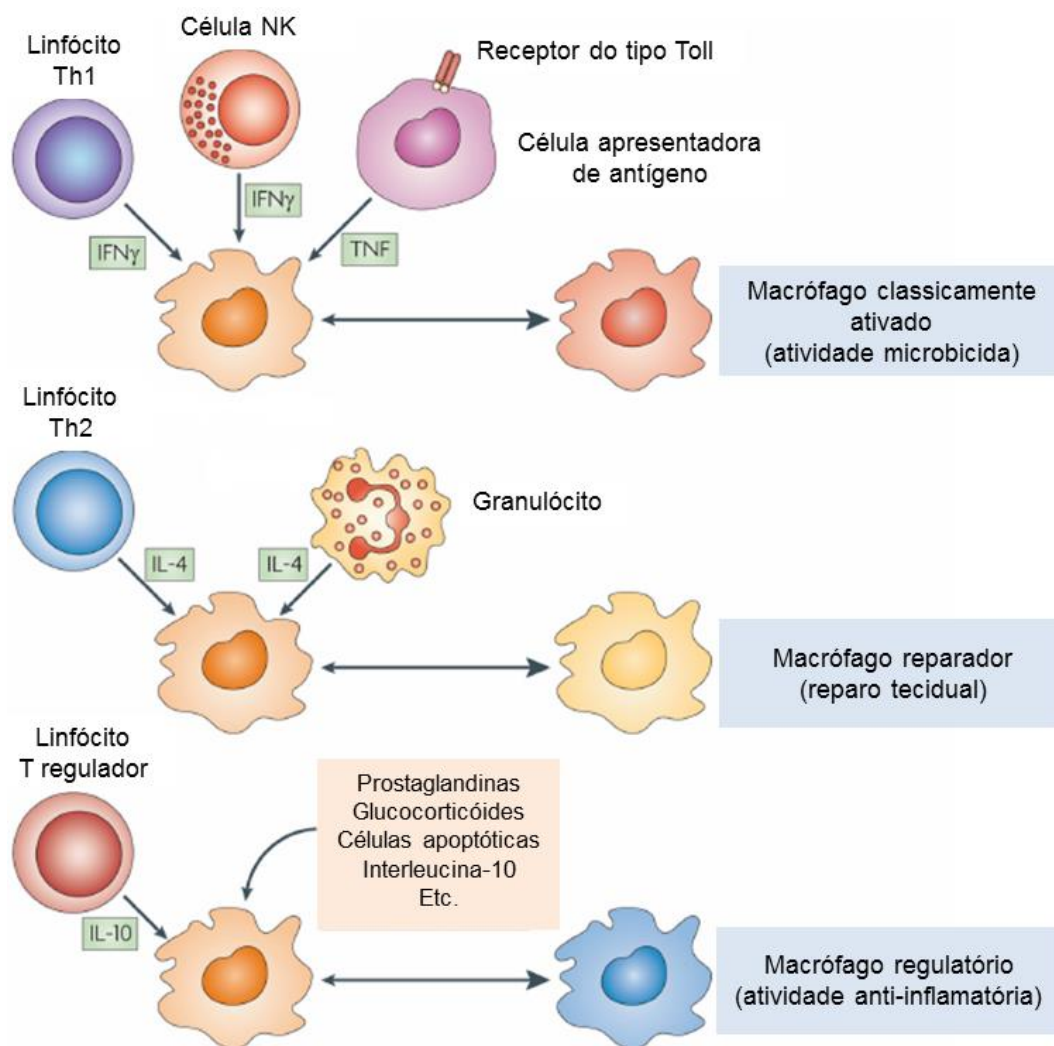
8 Os macrófagos são células mononucleares, fazem parte do sistema
9 imunológico e têm alta capacidade fagocítica. Desempenham importante papel
10 em respostas imunes, homeostase e reparo tecidual. Estas células, na maioria
11 das vezes, se diferenciam de monócitos sanguíneos derivados de células
12 hematopoiéticas da medula óssea. Os monócitos podem migrar para tecidos
13 estáveis ou em resposta a uma inflamação diferenciando-se em macrófagos
14 (van Furth e Cohn, 1968). Embora sua origem hematopoiética seja bem
15 determinada, estudos recentes revelam que macrófagos maduros residentes
16 nos tecidos afetados podem proliferar massivamente para aumentar o número
17 de células. Utilizando modelos animais Hashimoto e colaboradores (2013)
18 reavaliaram as possibilidades de origem dos macrófagos residentes em
19 tecidos. Eles observaram que mesmo quando os macrófagos residentes nos
20 pulmões e baço de camundongos C57BL/6 são afetados por irradiação, a auto
21 reposição tecidual, independente de monócitos circulantes, ainda ocorre
22 (Hashimoto *et al.*, 2013). Sabe-se que o processo inflamatório desencadeado
23 por infecção estimula a expansão de macrófagos nos tecidos afetados. Em
24 resposta imune do tipo Th2, a proliferação local de macrófagos residentes pode
25 ser dirigida pela presença de altos níveis de IL-4. A infecção de camundongos
26 com o nematoide *Litomosoides sigmodontis*, capaz de induzir perfil Th2, resulta
27 em baixo recrutamento de monócitos circulantes após 15 dias de infecção.
28 Entretanto, em apenas 6 dias, promove aumento no número de macrófagos
29 residentes reforçando a ideia de que monócitos circulantes não são fontes
30 exclusivas de macrófagos (Jenkins *et al.*, 2011).

31 Os macrófagos podem ser diferenciados de acordo com sua função.
32 Macrófagos do tipo M1 são ativados de forma clássica por estímulo a IFN- γ ,
33 TNF- α e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), tornando-se hábeis em fagocitar
34 e destruir microorganismos intracelulares (Nathan *et al.*, 1983, Stuehr e

1 Marletta, 1985; Martinez e Gordon, 2014). Essa destruição ocorre pela
2 produção de espécies reativas de oxigênio e aumento da indução de iNOS com
3 geração de NO (Stuehr e Marletta, 1985; Martinez e Gordon, 2014).
4 Macrófagos ativados com IFN- γ produzem maiores níveis de peróxido de
5 hidrogênio potencializando sua atividade microbicida contra *T. gondii* (Nathan
6 *et al.*, 1983). Além disso, a indução da iNOS por macrófagos M1 limita a
7 replicação de *T. gondii*, dessa forma para que o parasito se desenvolva em
8 macrófagos ativados é necessária redução nos níveis de NO intracelular
9 (Seabra *et al.*, 2002; Lüder *et al.*, 2003).

10 Macrófagos com perfil M2, conhecidos como reparadores, são ativados
11 alternativamente e são eficientes em produzir componentes envolvidos na
12 formação de matriz extracelular e reparo tecidual. As IL-4 e IL-13 são capazes
13 de converter macrófagos residentes em células reparadoras (Doyle *et al.*, 1994;
14 Martinez e Gordon, 2014). O tratamento *in vitro* de macrófagos com IL-4 e IL-
15 13 prejudica a produção de citocinas pró-inflamatórias, NO e radicais de
16 oxigênio (Edwards *et al.*, 2006). A atividade da arginase nesses macrófagos
17 converte arginina em ornitina para a produção de poliaminas e colágeno,
18 contribuindo assim para as funções reparadoras (Mosser e Edwards, 2008).

19 A atuação inflamatória exacerbada dos macrófagos deve ser controlada
20 para evitar danos teciduais. Macrófagos reguladores respondem a IL-10, TGF- β
21 e estímulos como glucocorticóides e células apoptóticas tornando-os potentes
22 inibidores da inflamação (Fadok *et al.*, 1998; Mosser e Edwards, 2008).
23 Entretanto, por essa característica, macrófagos regulatórios são alvos fáceis de
24 parasitos. Muitas vezes este perfil regulatório pode ser simulado por esses
25 patógenos a fim de burlar o sistema imune, como é o caso dos protozoários
26 *Leishmania* spp. (Barral-Netto *et al.*, 1992), *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1995; DaMatta
27 *et al.*, 2007) e *T. gondii* (Bermudez *et al.*, 1993; Guillermo e DaMatta, 2004;
28 Seabra *et al.*, 2004). A figura 6 esquematiza os perfis M1, M2 e regulador de
29 macrófagos.



1

2 Figura 6 – Esquema demonstrativo de citocinas produzidas por células imunes
 3 determinando perfis de macrófagos classicamente ativados, reparadores ou
 4 regulatórios. Macrófagos classicamente ativados surgem em resposta a IFN- γ
 5 produzidos por linfócitos Th1 e células NK ou TNF produzido por células
 6 apresentadoras de antígeno. Macrófagos reparadores são gerados em
 7 resposta à IL-4 produzida por linfócitos Th2 e granulócitos. Macrófagos
 8 regulatórios surgem em resposta à IL-10 e outros estímulos. Modificado de
 9 Mosser e Edwards (2008).

10

11

12 2.5 Óxido nítrico sintase induzida e óxido nítrico

13

14 O gás NO é secretado por diferentes tipos de células e possui distintas
 15 funções no organismo, seja como neurotransmissor no sistema nervoso,
 16 vasodilatador no sistema cardiovascular ou agente microbicida no sistema
 17 imunológico (Nathan, 1992). Devido a sua alta reatividade química o NO possui

1 vida útil curta, sendo rapidamente oxidado a formas mais estáveis, nitrito e
2 nitrato (Bogdan, 2015).

3 Os primeiro estudos associando a produção de óxidos de nitrogênio à
4 células mamíferas foram realizados em 1981. Pesquisadores observaram que
5 a taxa de excreção de nitrato em ratos *germ-free* era maior que a ingestão,
6 sugerindo que a síntese de nitrato é processo comum em células de mamíferos
7 (Green *et al.*, 1981a). Esta hipótese foi reforçada pelos resultados da
8 investigação do metabolismo de nitrato em homens jovens e saudáveis. A
9 quantidade de nitrato excretado na urina foi quatro vezes maior que a taxa
10 ingerida. Esse padrão independe da quantidade de nitrato consumido na dieta.
11 Green e colaboradores atribuíram a biossíntese endógena de nitrato como
12 fonte do excesso (Green *et al.*, 1981b).

13 A produção de NO ocorre através de uma oxirredução, na qual L-
14 arginina é convertida em L-citrulina e NO. Esta reação é catalisada pela enzima
15 homodimérica, óxido nítrico sintase (NOS), presente em 3 isoformas: NOS1
16 (neuronal), NOS2 (induzida) e NOS3 (endotelial). NOS2, conhecida como
17 iNOS, é uma isoforma induzida por estímulos imunológicos, enquanto NOS1 e
18 NOS3, são expressas constitutivamente (Bogdan, 2015).

19 A produção de NO por macrófagos ativados é uma importante via de
20 defesa contra infecções. Stuehr e Marletta (1985) demonstraram que
21 macrófagos murinos produzem elevado nível de nitrito e nitrato em resposta à
22 infecção por *Mycobacterium bovis* ou quando em contato com LPS de
23 *Escherichia coli*. Camundongos sensíveis ao estímulo por LPS produzem 5 a 6
24 vezes mais nitrato no sangue e urina do que camundongos não sensíveis. As
25 taxas também são elevadas no tratamento de macrófagos extraídos desses
26 animais (Stuehr e Marletta, 1985).

27 Em infecção *in vivo* com *T. gondii* o NO é capaz de induzir a conversão
28 de taquizoítos em bradizoítos. A ativação de macrófagos murinos derivados de
29 medula óssea com IFN- γ ou LPS induz a expressão de antígenos específicos
30 de bradizoítos. A conversão também é estimulada por níveis exógenos de NO
31 após o tratamento dos macrófagos com nitroprussiato de sódio - um doador de
32 NO (Bohne *et al.*, 1994).

33 Em contrapartida, como mecanismo de defesa, *T. gondii* é capaz de
34 reduzir a produção de NO em macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002; 2004;

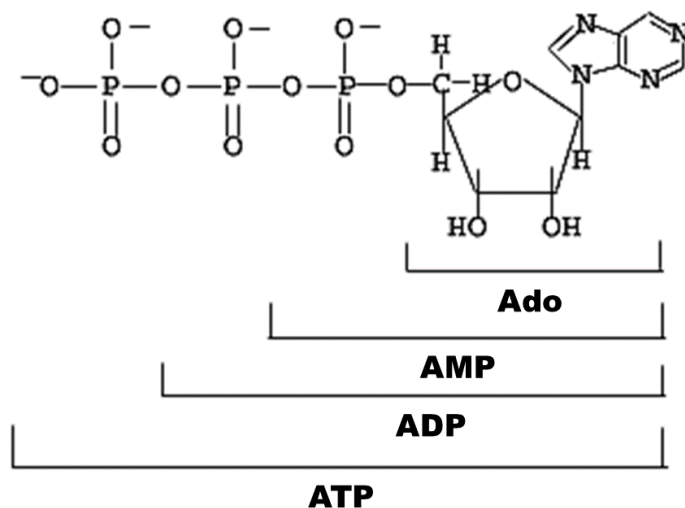
1 Guillermo e DaMatta, 2004; Dos Santos *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2016). A
2 subpopulação PS⁺ de *T. gondii* induz a produção de TGF- β 1 em tecidos ou
3 macrófagos infectados via externalização de PS, mimetizando uma célula
4 apoptótica (Barcinski *et al.*, 2003; Seabra *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*, 2011).
5 A PS exposta estimula a auto secreção de TGF- β 1 por macrófagos acarretando
6 na ativação do fator de transcrição Smad2 (membro de uma família de
7 proteínas citoplasmáticas), inibição da expressão da NOS2 (Fadok *et al.*, 1998)
8 e redução dos níveis de NO citoplasmático pela degradação da enzima via
9 proteossomo (Padrão *et al.*, 2014). O TGF- β ativa o receptor serina-treonina
10 cinase que leva a fosforilação de Smad2 (Smad2P) e associação com Smad4.
11 O complexo Smad2/ Smad4 migra para o núcleo inibindo a expressão da NOS
12 2 (Nakao *et al.*, 1997). Dessa forma, a translocação nuclear de Smad2P é
13 indicativo da sinalização via TGF- β 1.

14

15 2.6 Receptores purinérgicos, nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

16

17 Os nucleosídeos e nucleotídeos de adenina são importantes em vários
18 processos biológicos (Ralevic e Burnstock, 1998). O nucleotídeo
19 adenosina-5`-trifosfato (ATP) é uma das moléculas energéticas mais
20 conhecidas por seu papel no metabolismo. A produção de ATP envolve a
21 ligação do fosfato inorgânico (Pi) a adenosina-5`-difosfato (ADP). A energia
22 contida nessa molécula pode ser utilizada em diversos processos através da
23 hidrólise de seu fosfato terminal gerando os nucleotídeos ADP e
24 adenosina-5`-monofosfato (AMP), e posteriormente o nucleosídeo adenosina
25 (Ado) (Roy *et al.*, 2016) (Figura 7). Inicialmente os estudos concentravam sua
26 relevância nas ligações energéticas envolvendo os grupos fosfatos de
27 nucleotídeos. Contudo essas moléculas também desempenham um papel
28 essencial na sinalização, atuando como mensageiros extracelulares (Ralevic e
29 Burnstock, 1998; Bours *et al.*, 2006; Idzko *et al.*, 2014).



1
2 Figura 7 – Estrutura de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina. Nucleotídeos:
3 adenosina-5`-trifosfato (ATP), adenosina-5`-difosfato (ADP),
4 adenosina-5`-monofosfato (AMP); nucleosídeo: Adenosina (Ado). Modificado
5 de [http://salabioquimica.blogspot.com.br/2017/06/metabolismo-energetico-1-o-](http://salabioquimica.blogspot.com.br/2017/06/metabolismo-energetico-1-o-atp-e-3.html)
6 [atp-e-3.html](http://salabioquimica.blogspot.com.br/2017/06/metabolismo-energetico-1-o-atp-e-3.html).

7

8 Em ambiente extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos interagem
9 com receptores purinérgicos do tipo P1 ou P2 (Burnstock, 1978). Receptores
10 P1 reconhecem Ado e pertencem a família de receptores acoplados a proteína
11 G (GPCR), exibindo sete domínios transmembrana (Fredholm *et al.*, 1994).

12 Os GPCR atuam por meio da substituição de GDP por GTP pela ação do
13 GEF (*guanosine nucleotide exchange factor*). Assim, a subunidade α do GPCR
14 dissocia-se do dímero $\beta\gamma$ e inicia cascatas de sinalização intracelular. Estes
15 receptores apresentam isoformas baseadas na estrutura e sequência da
16 subunidade α , sendo as principais: G_s , G_q e G_i (Moura e Vidal, 2011).

17 Os receptores P1 apresentam 4 subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Os
18 receptores de alta e baixa afinidade por Ado, A_{2A} e A_{2B} , respectivamente, são
19 acoplados a proteína G_s . Atuam estimulando a adenilato ciclase, enzima
20 responsável pela formação de AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP (Fredholm
21 *et al.*, 1994). O aumento na concentração de AMPc intracelular ativa a proteína
22 cinase dependente de AMPc que fosforila estruturas intracelulares ativando
23 fatores de transcrição que regulam negativamente citocinas inflamatórias e
24 inibem a ativação do NF- κ B (Wen *et al.*, 2010; Moura e Vidal, 2011). Os
25 receptores A_1 e A_3 se ligam nas isoformas G_i , responsáveis pela inibição da
26 adenilato ciclase impedindo a desativação precoce das células imunes

1 (Fredholm *et al.*, 1994). Os subtipos A₁ e A₃ são expressos em baixos níveis na
2 superfície dos macrófagos (Hasko e Cronstein, 2013). Receptores de Ado
3 modulam a resposta imune celular evitando um processo inflamatório
4 exacerbado pela inibição da produção de IL-12, NO, TNF- α , além de estimular
5 a produção de IL-10 (Haskó *et al.*, 1996; Le Moine *et al.*, 1996; Haskó *et al.*,
6 2000; Khoa *et al.*, 2001; Hasko e Cronstein, 2013).

7 Os receptores P2 são ativados por ATP ou outros nucleotídeos e podem
8 ser divididos nas subfamílias P2Y e P2X (Fredholm *et al.*, 1994; Idzko *et al.*,
9 2014). Os P2Y são GPCR com sete segmentos transmembrana. Em
10 mamíferos foram caracterizados oito subtipos que reconhecem grupos de
11 nucleotídeos variados entre purinas e pirimidinas: P2Y_{12, 13, 14} (acoplados a
12 proteína G_i) e P2Y_{1, 2, 4, 6, 11} (acoplados a proteína G_q) (Jacobson *et al.*, 2015).
13 Nos receptores acoplados a proteína G_q, a sinalização gerada ativa a
14 fosfolipase C elevando os níveis de Ca⁺² intracelular que favorece a resposta
15 inflamatória (Moura e Vidal, 2011).

16 Os receptores P2X são canais iônicos ativados por ATP (Surprenant e
17 North, 2009). São constituídos de três subunidades, cada uma com dois
18 domínios transmembrana. A ligação de três moléculas de ATP na região
19 extracelular abre o canal acarretando no influxo de Na⁺ e Ca⁺², e efluxo de K⁺
20 (Kawate *et al.*, 2009). Cerca de sete subtipos são descritos (P2X₁₋₇)
21 (Surprenant e North, 2009). O subtipo P2X₇ se destaca pelo seu envolvimento
22 na sinalização entre macrófagos ou outras células da resposta imune
23 (neutrófilos, mastócitos e linfócitos) e células alvo (Ralevic e Burnstock, 1998;
24 Bours *et al.*, 2006; Surprenant e North, 2009; Chaves *et al.*, 2009; Corrêa *et al.*,
25 2010; Morandini *et al.*, 2014).

26

27 2.7 Sinalização purinérgica e resposta imune

28

29 O processo inflamatório induz células a liberarem ATP intracelular no
30 ambiente extracelular. Crane e colaboradores mostraram que infecção por *E.*
31 *coli* enteropatogênica libera ATP em diversas linhagens de células humanas
32 (Crane *et al.*, 2002). Essa liberação pode ocorrer de forma descontrolada
33 (durante a necrose) ou controlada por canais específicos como conexinas
34 (junções gap que podem funcionar como canais comunicantes entre citoplasma

1 e meio extracelular) (Eltzschig *et al.*, 2006), panexinas (canais
2 transmembranas) (Chekeni *et al.*, 2010) e vesículas exocíticas (Sakaki *et al.*,
3 2013).

4 Níveis extracelulares de ATP estimulam a produção de INF- γ e IL-2 por
5 células T (Langston *et al.*, 2003) e a quimiotaxia de neutrófilos (Linden, 2006).
6 O ATP também provoca a liberação da citocina inflamatória IL-1 β . Análise do
7 fluido extracelular coletado do peritônio de camundongos tratados com doses
8 de LPS e ATP revela aumento na secreção de IL-1 β . O mesmo efeito não
9 ocorre no tratamento apenas com LPS, sugerindo que a liberação de IL-1 β está
10 associada a lise celular e sinalização purinérgica (Griffiths *et al.*, 1995). Esta
11 hipótese foi confirmada por Buell *et al.* (1998) com o tratamento de monócitos
12 humanos THP-1 com anti-P2Y₇. Em 2001, Solle observou resultados similares,
13 no qual a exposição de camundongos e macrófagos P2Y₇^{-/-} ao ATP demonstra
14 ineficiência na secreção de IL-1 β mesmo na presença de LPS (Solle *et al.*,
15 2001). Além disso, o aumento no nível de Ca⁺² intracelular desencadeado pela
16 ativação de receptores de nucleotídeos P2X e P2Y estimula a produção de
17 espécies reativas de oxigênio por macrófagos potencializando os mecanismos
18 de defesa (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1997). Macrófagos RAW 264.7 ativados
19 com LPS tratados com o antagonista do receptor P2X₇ têm menor expressão
20 de iNOS e conseqüentemente menor produção de NO (Hu *et al.*, 1998).

21 No decorrer da resposta imune deve existir um balanço entre as
22 respostas pró-inflamatória e anti-inflamatória. Dessa forma, em contrapartida
23 ao perfil inflamatório gerado pelo ATP, a sinalização desencadeada por Ado
24 assume caráter anti-inflamatório (McCallion *et al.*, 2004).

25 Baixos níveis de Ado, característico de estagio inflamatório inicial, ativam
26 receptores A₁ em neutrófilos promovendo maior adesão endotelial e
27 quimiotaxia. Contudo, o aumento nas taxas de Ado extracelular ativa os
28 receptores A_{2A} que atenuam a ativação de neutrófilos por inibir a geração de
29 ânions superóxido, importante agente na eliminação de microorganismos
30 (Cronstein *et al.*, 1983; Cronstein *et al.*, 1990).

31 A Ado aumenta a produção de IL-10 em macrófagos e monócitos via
32 receptor A₁ ou A_{2A} mesmo mediante ativação por LPS ou TNF- α (Haskó *et al.*,
33 1996, Le Moine *et al.*, 1996; Khoa *et al.*, 2001). Receptores do tipo A_{2A} também
34 inibem a produção de IL-12 e TNF- α em macrófagos murinos J774-A1 de

1 maneira independente de IL-10 (Haskó *et al.*, 2000). Além disso, receptores de
2 adenosina A₂ podem regular a produção de NO em macrófagos. Este fato foi
3 demonstrado por Haskó e colaboradores utilizando macrófagos RAW 264.7,
4 onde o pré-tratamento com moléculas agonistas de A₂, mostra redução nos
5 níveis de nitrito e nitrato (Haskó *et al.*, 1996). O pré-tratamento de
6 camundongos com agonista dos receptores A₁ e A₃ também reduz as
7 concentrações plasmáticas de TNF- α (Haskó *et al.*, 1996). Estudo realizado em
8 2004, sugere que essa regulação de TNF- α ocorre de forma pós transcricional
9 pela diminuição da estabilidade de mRNA em um mecanismo envolvendo a
10 inibição da atividade de p38 MAPK (Fotheringham *et al.*, 2004).

11 A complexidade da sinalização purinérgica realça a importância do
12 controle de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares para a manutenção da
13 homeostase.

14

15 2.8 Ectonucleotidases

16

17 Por seu papel crítico na sinalização purinérgica as concentrações de
18 nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares precisam ser reguladas. Este
19 controle pode ser realizado por enzimas localizadas na membrana plasmática,
20 denominadas ectonucleotidases (Plesner, 1995; Zimmermann, 2001). As
21 ectonucleotidases foram descritas inicialmente como uma nova classe de
22 ATPases que possuíam sítio ativo extracelular: as Ecto-ATPases (Plesner,
23 1995). Entretanto, este grupo é constituído por um conjunto complexo de
24 proteínas, dentre elas enzimas transmembranas com sítio catalítico voltado
25 para o meio extracelular ou isoformas solúveis. Fazem parte desse grupo as
26 ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-5'-nucleotidase
27 (5'-NT), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase e as fosfatases alcalinas.
28 As famílias E-NTPDases, pirofosfatase/fosfodiesterase e fosfatases alcalinas
29 são capazes de hidrolisar o ATP e o ADP até AMP (Zimmermann, 2001). Já a
30 5'-NT (também conhecida como CD73 em humanos) hidrolisa o AMP até Ado
31 (Colgan *et al.*, 2006). A atividade das ectonucleotidases permite também a
32 recuperação de purinas pela "via de salvação", pois a Ado liberada no final das

1 hidrólises pode ser capturada e reutilizada pelas células na síntese de ATP
2 intracelular (Moffatt e Ashihara, 2002).

3 As E-NTPDases realizam hidrólises dependentes de íons Ca^{2+} e Mg^{2+}
4 (Plesner, 1995). Existem 8 membros na família das E-NTPDases. As E-
5 NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão na membrana com o sítio ativo extracelular
6 (Zimmermann, 2001). As E-NTPDases 4 e 7 possuem o sítio catalítico voltado
7 para o lúmen de organelas citoplasmáticas auxiliando no controle dos níveis de
8 nucleotídeos dentro dos compartimentos (Wang e Guidotti, 1998; Biederbick *et*
9 *al.*, 1999, Zimmermann, 2001). Já as E-NTPDases 5 e 6 podem ser secretadas
10 na forma solúvel (Braun *et al.*, 2000; Zimmermann, 2001).

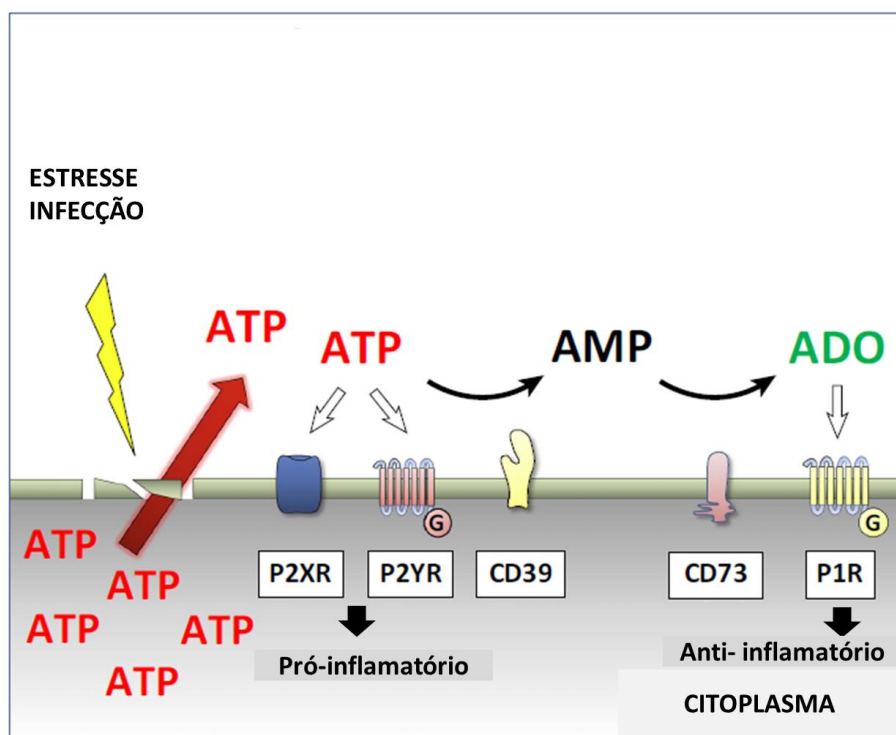
11 Há estudos que se referem às E-NTPD-ases 1 como Ecto-ATPases e
12 outros como aspirases. Entretanto, análise molecular demonstra homologia
13 entre estas formas (Wang e Guidotti, 1996). O termo aspirase foi proposto em
14 1945 para diferenciar as E-NTPDases das outras ATPases descritas (P, F e V),
15 já que as primeiras são capazes de hidrolisar os 2 Pi do ATP, enquanto as
16 segundas só hidrolisam o Pi terminal (Battastini *et al.*, 2011). Membros desta
17 família podem ser inibidos de forma não competitiva por substâncias como
18 Suramina e 4,4'-diisothiocyanostylbene 2*,2*-disulfonic acid (DIDS) (Beukers *et*
19 *al.*, 1995; Bültmann *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1996).

20 As 5'-NT podem ser encontradas em sua forma aderida à membrana
21 ancoradas por grupamento GPI (glicosilfosfatidilinositol) ou solúvel, em ambos
22 casos são capazes de hidrolisar e controlar as taxas internas de uma variedade
23 de nucleotídeos 5'-monofosfatados (Colgan *et al.*, 2006).

24 A expressão de ectonucleotidases pode ser regulada em resposta à
25 agentes infecciosos. Kas-Deelen e colaboradores relataram que células
26 endoteliais infectadas com citomegalovírus sofrem aumento na expressão e
27 atividade enzimática de E-NTPDase e 5'-NT (Kas-Deelen *et al.*, 2001). Além
28 disso, participam da resposta imune, pois a atividade de E-NTPDases1,
29 hidrolizando nucleotídeos tri e difosfatados, diminui a produção de IFN- γ , mas
30 não de IL-4, em linfócitos T (Langston *et al.*, 2003). A infecção de
31 camundongos CD73^{-/-} com *T. gondii* aumenta a susceptibilidade à doença, com
32 resposta inflamatória exacerbada (Mahamed *et al.*, 2015).

33 Processos inflamatórios e imunológicos causam danos celulares e
34 consequente liberação de nucleotídeos de efeito pró-inflamatório (Crane *et al.*,

1 2002; Langston *et al.*, 2003). Dessa forma, as ectonucleotidasas têm
 2 importante papel na regulação imunológica via sinalização purinérgica, pois as
 3 clivagens de nucleotídeos à nucleosídeos evitam um processo inflamatório
 4 exacerbado (McCallion *et al.*, 2004; Yegutkin, 2014; Mahamed *et al.*, 2015). A
 5 figura 8 demonstra de forma simplificada a sinalização purinérgica na resposta
 6 imune.



7

8 Figura 8 – Sinalização purinérgica e resposta imune. Situações como estresse
 9 e infecção induz liberação de ATP para o meio extracelular. O ATP é
 10 reconhecido por receptores P2X e P2Y aprimorando a resposta pró-
 11 inflamatória. Ectonucleotidasas (CD39 e CD73) presentes na superfície das
 12 células hidrolisam o ATP a Adenosina (Ado) que é reconhecido por receptores
 13 P1 atenuando a resposta inflamatória. Modificado de Ferrari *et al.* (2016).

14

15 2.9 Ectonucleotidasas e parasitos

16

17 A sinalização purinérgica assume relevante papel na modulação das
 18 respostas imunes através de receptores que reconhecem nucleosídeos e
 19 nucleotídeos de efeito anti ou pro-inflamatório (Bours *et al.*, 2006). Ao controlar
 20 os níveis de nucleotídeos extracelulares, as ectonucleotidasas, em especial E-
 21 NTPDases, têm papel importante na regulação desta sinalização
 22 (Zimmermann, 2001). Entretanto, estudos têm descrito a atividade de
 23 ectonucleotidasas em diversos parasitos como *Neospora caninum*,

1 *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica*,
2 *Trypanosoma cruzi*, *T. gondii*, *Leishmania* spp. e alguns fungos (Sansom *et al.*,
3 2008), sugerindo inclusive que em alguns casos essa atividade possa funcionar
4 como fator de virulência e evasão imune.

5 No tegumento de *S. mansoni* foi identificado a presença de Ecto-
6 ATPases capazes de regular a concentração de nucleotídeos de purina no
7 meio externo, funcionando como um mecanismo de evasão ao sistema imune
8 por evitar a ativação plaquetária prejudicial à sobrevivência do parasito
9 (Vasconcelos *et al.*, 1993). Em *E. histolytica* patogênica existe maior atividade
10 E-NTPDases do que em formas não patogênica ou de vida livre, indicando um
11 papel na virulência (Barros *et al.*, 2000).

12 Diversos estudos identificaram atividade de E-NTPDase na superfície de
13 parasito *T. cruzi*. A atividade de E-NTPTase está presente na superfície das
14 formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, entretanto, a
15 atividade ecto-ATPásica é maior nas formas infectivas tripomastigota e
16 amastigota, sugerindo mecanismo de virulência (Bisaggio *et al.*, 2003; Fietto *et*
17 *al.*, 2004; Meyer-Fernandes *et al.*, 2004). Além disso, a inibição destas enzimas
18 resulta em redução da adesão e infectividade em macrófagos (Bisaggio *et al.*,
19 2003).

20 A presença de ecto-ATPase de superfície e E-NTPDase capaz de
21 hidrolisar ATP até Ado também foi relatada em espécies de *Leishmania*
22 (Meyer-Fernandes *et al.*, 1997; Berredo-Pinho *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*,
23 2006). A ativação desta enzima é um importante mecanismo para recuperação
24 de purinas para síntese de nucleotídeos (Pinheiro *et al.*, 2006), entretanto,
25 descobertas têm levantado a hipótese de que esta atividade possa estar
26 associada à patogenicidade. Como provas que apontam para isso, está o fato
27 de amastigotas e promastigotas virulentos de *L. amazonensis* apresentarem
28 maior atividade enzimática que promastigotas que tiveram sua virulência
29 atenuada (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2006; de Souza *et al.*,
30 2010b). Além disso, a inibição da atividade de E-NTPDase diminui a taxa de
31 sobrevivência do parasito com aumento da produção de NO por macrófagos
32 (Gomes *et al.*, 2015). Estudo da quantificação da hidrólise de nucleotídeos e
33 infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 com promastigotas de *L.*
34 *amazonensis*, *L. braziliense* e *L. major* revelam maior gravidade nas lesões e

1 nível de hidrólise de ATP, ADP e AMP na presença de parasitos de *L.*
2 *amazonensis* (Marques-da-Silva *et al.*, 2008). Isto corrobora com a hipótese
3 onde o aumento da produção de Ado é importante para o desenvolvimento da
4 lesão uma vez que parasitos do gênero *Leishmania* aproveitam a
5 imunossupressão gerada pela ativação do receptor A_{2A} que reconhece Ado
6 (Lima *et al.*, 2017).

7 Em 1983, foi identificado em cepa RH de *T. gondii* uma enzima
8 citoplasmática denominada NTPase, ativada por íons Ca^{+2} e Mg^{+2} , capaz de
9 hidrolisar ATP e ADP (com menor eficiência) (Asai *et al.*, 1983). Análises
10 genéticas identificaram 3 genes, codificadores das NTPase 1, NTPase 2 e
11 NTPase 3, com transcrição das formas 1 e 3 (Bermudez *et al.*, 1994). Em 1995,
12 essas enzimas foram divididas em 2 classes de acordo com sua atividade:
13 NTPase I (NTPase 3) e NTPase II (NTPase 1). A diferença básica entre os 2
14 grupos consiste na afinidade dos substratos para hidrólise. Embora sejam
15 capazes de hidrolisar nucleotídeos de purina ou pirimidina, tri e difosfatados, a
16 NTPase I apresenta maior especificidade por ATP (Asai *et al.*, 1995).

17 Sibley *et al.* demonstraram que estas NTPases de *T. gondii* estão
18 presentes em organelas chamadas grânulos densos, sendo secretadas no
19 lúmen do VP após a invasão. Isto sugere que este mecanismo seja um meio de
20 recuperação de purinas através do processamento de nucleotídeos do
21 hospedeiro, uma vez que este parasito não consegue realizar a síntese *de*
22 *novo* de nucleotídeos (Sibley *et al.*, 1994).

23 Por muito tempo as NTPases estiveram associadas ao processo de
24 recuperação de purinas, contudo, Asai e colaboradores propuseram a primeira
25 associação entre estas enzimas e a virulência de *T. gondii*. Em análise
26 genética foi observado que 8 das 10 cepas virulentas de *T. gondii* estudadas,
27 expressam o gene para NTPase 3. Em contrapartida o gene para NTPase 1 é
28 expresso em cepas virulentas e avirulentas (Asai *et al.*, 1995). Estudo aponta
29 que a secreção e ativação de NTPase 3 está relacionada ao rápido egresso do
30 parasito (Silverman *et al.*, 1998). Contudo, experimentos com taquizoítos da
31 cepa virulenta GT1, *knockout* para NTPases, revela que estas enzimas não
32 estão envolvidas com a virulência em camundongos CD1 (Olias e Sibley,
33 2016).

1 Ensaio com anticorpo contra NTPase de *T. gondii* revelou a presença
2 dessas enzimas na região anterior do parasito, nos grânulos densos e na
3 superfície de taquizoítos. A incubação de taquizoítos com anticorpo 6C6, capaz
4 de reconhecer NTPase, reduziu a capacidade infectiva em células Vero,
5 indicando que essas NTPases podem funcionar também como mecanismo
6 invasivo (Kikuchi *et al.*, 2001).

7 Sendo assim, as descobertas descritas sugerem que a presença e
8 atividade destas enzimas em parasitos pode subverter e evitar mecanismos de
9 defesa do hospedeiro, uma vez que Ado gerada no processo induz uma
10 resposta anti-inflamatória essencial para a sobrevivência de parasitos e
11 sucesso infectivo (Vasconcelos *et al.*, 1993; Sansom, 2008; Gomes *et al.*, 2015;
12 Lima *et al.*, 2017).

13

1 **3 Objetivos**

2

3 3.1 Objetivo geral

4

5 Investigar o possível papel da atividade de ecto-ATPases nas
6 subpopulações de PS de *T. gondii* como mecanismo evasivo durante infecção
7 *in vitro* em células hospedeiras.

8

9 3.2 Objetivos específicos

10

- 11 ➤ Quantificar a atividade ecto-ATPásica nas subpopulações PS⁺ e PS⁻ de
12 *T. gondii*.
- 13 ➤ Avaliar o efeito dos inibidores DIDS e suramina na atividade ecto-
14 ATPásica de subpopulações PS⁺ e PS⁻ de *T. gondii*.
- 15 ➤ Avaliar o papel de ecto-ATPases de subpopulações PS⁺ e PS⁻ de *T.*
16 *gondii* na inibição da produção de NO de macrófagos murinos ativados e
17 infectados.
- 18 ➤ Analisar o envolvimento da sinalização por TGF-β1 em macrófagos
19 murinos ativados após interação com subpopulações de *T. gondii*
20 tratadas com inibidor de atividade ecto-ATPásica.

21

1 **4 Material e métodos**

2

3 4.1 Células hospedeiras

4

5 Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem peritoneal de
6 camundongos machos Swiss com 5 semanas, com 10 mL de solução de
7 Hanks. As células foram centrifugadas a 500 x g por 10 min em 4°C,
8 ressuspendidas em *Dulbeccos Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma) para
9 contagem na câmara de Neubauer. Os macrófagos foram plaqueados em
10 lamínulas de vidro em placas de 24 poços (1x10⁶ células por poço) ou
11 diretamente em placas de 96 poços (5x10⁵ células por poço). Após 1 h de
12 aderência em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram
13 lavadas com solução de Hanks a 37°C e cultivadas com DMEM contendo 10%
14 de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e ativadas com 100 U/mL de IFN- γ
15 recombinante de camundongo (Sigma) e 100 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*
16 0111:B4, Sigma) em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h antes
17 da interação com os parasitos (Seabra *et al.*, 2002). Esse estudo está de
18 acordo com as leis brasileiras nº 11794/08. O protocolo de estudo animal foi
19 aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal da UENF (Protocolo 360).

20

21 4.2 Separação das subpopulações de taquizoítos PS⁺ e PS⁻ de *T. gondii*

22

23 Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos por passagens na
24 cavidade peritoneal de camundongos Swiss (com 3 semanas, adquiridos no
25 biotério da UENF) a cada 2 ou 3 dias (Seabra *et al.*, 2002). Após esse período,
26 foi realizado o lavado peritoneal injetando 5 mL de tampão (HEPES 10mM,
27 NaCl 150mM, CaCl₂ 2,5mM) em cada animal. O lavado foi centrifugado a 45 x g
28 por 5 min a 4°C para remover leucócitos e restos de células. O sobrenadante
29 foi centrifugado novamente a 1.000 x g por 10 min a 4°C. Após ressuspensão
30 em tampão (HEPES 10mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 2,5mM) e contagem em
31 câmara de Neubauer, os taquizoítos foram incubados com anexina V
32 conjugada em microesferas magnéticas (Annexin V MicroBead Kit nº 130-090-
33 201, Miltenyl Biotec) (10 μ l para 10⁷ parasitos) por 40 min em temperatura
34 ambiente. A anexina V possui ligação específica em PS (Fadok *et al.*, 1998b).

1 As subpopulações foram separadas por passagem em coluna magnética LS
2 próprio para separador MidMacs (nº 130-042-401/ 130-042-302, Miltenyl Biotec)
3 (Dos Santos *et al.*, 2011). Após separação, as subpopulações foram
4 centrifugadas a 2.300 x *g* por 10 min a 4°C para nova contagem em Neubauer.

5

6 4.3 Quantificação de atividade ecto-ATPásica

7

8 A atividade ecto-ATPásica foi quantificada pelo aumento de Pi oriundo
9 da hidrólise de ATP. Após a separação das subpopulações PS⁺ e PS⁻ (tópico
10 4.2) os parasitos intactos foram incubados em 50 µl de meio de reação: 116,0
11 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5,5 mM D-glicose, 50,0 mM do tampão HEPES-Tris, ATP
12 (100 µM), [γ -³²Pi] ATP (104 Bq/nmol). Em parte dos tubos que receberiam os
13 parasitos foi adicionado MgCl₂ (5 mM) atuando como cofator da reação. Neste
14 ensaio foram utilizados os inibidores da atividade ecto-ATPásica DIDS (0,5mM)
15 (Sigma) e suramina (0,5mM) (Sigma).

16 Os grupos experimentais incluíram: a) subpopulações isoladas na
17 presença ou ausência de MgCl₂, b) subpopulações isoladas (com inibidores
18 DIDS ou suramina) na presença ou ausência de MgCl₂. Os parasitos foram
19 adicionados no fim da preparação dos tubos, após a adição de H₂O destilada
20 (para volume final de 250 µl).

21 Os controles brancos consistiram em amostras similares ao
22 experimental, porém sem a presença das subpopulações de *T. gondii*. Em
23 alguns controles, parasitos foram adicionados somente após o término da
24 reação, com objetivo de estimar a concentração de Pi resultante da hidrólise
25 espontânea do ATP em solução.

26 Após 1 h a 30°C, a reação foi interrompida pela adição de 500 µl de
27 carvão-ativado HCl (1,0 M) facilitando a precipitação do ATP não hidrolisado.
28 Dessa forma, após a centrifugação a 1500 x *g* por 15 min o ATP foi
29 sedimentado, permanecendo no sobrenadante apenas o Pi das moléculas de
30 ATP hidrolisadas. O volume de 200 µl do sobrenadante foi coletado e o ³²Pi
31 liberado foi quantificado utilizando contador de cintilação (Berredo-Pinho *et al.*,
32 2001; Bisaggio *et al.*, 2003). A atividade enzimática foi expressa pela liberação
33 de nmol de Pi induzida por 1,12 x 10⁶ parasitos em 1 h.

34

1 4.4 Inibição de ecto-ATPase e interação com células hospedeiras

2

3 Após separação em coluna magnética (tópico 4.2) as subpopulações
4 PS⁺ e PS⁻ de *T. gondii* foram pré-incubadas por 30 min com o inibidor da ecto-
5 ATPase, DIDS, nas concentrações de 0,5mM ou 1mM.

6 As células cultivadas em placas de 96 poços (tópico 4.1) foram
7 infectadas com 3x10⁵ parasitos e o sobrenadante dos poços foi coletado para
8 dosagem de NO. Os macrófagos mantidos em placas de 24 poços foram
9 infectados com 1x10⁶ taquizoítos e as lamínulas coletadas para ensaios de
10 imunomarcção.

11 Após 1 h de infecção, as células hospedeiras foram lavadas com solução
12 de Hanks a 37°C, mantidas em DMEM com 10% de SFB e reativadas com 100
13 U/mL de IFN- γ recombinante de camundongo e 100 ng/mL de LPS. A interação
14 foi realizada por 2, 24 ou 48 h em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

15

16 4.5 Dosagem de NO

17

18 A produção de NO foi avaliada pela dosagem de nitrito utilizando o
19 reagente de Griess (1 volume de 1 % de Sulfanilamida em 5 % de ácido
20 ortofosfórico em água deionizada com volume igual de 0,1 % de N-[1-Naphthyl]
21 Ethylenediamina em água deionizada) na proporção de 1:1 com o
22 sobrenadante da cultura mantida em placa de 96 poços por 24 e 48 h (tópico
23 4.4). As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de placa de 96
24 poços (540 nm) e quantificadas segundo curva padrão feitas com quantidades
25 de nitrito de sódio definidas, diluídas no meio de cultura (Green *et al.*, 1982).

26

27 4.6 Imunomarcção de iNOS e Smad2P

28 Para verificar a expressão de iNOS, e se sua inibição envolveu a
29 sinalização via TGF- β , na presença ou ausência do inibidor DIDS, foi realizada
30 imunolocalização da enzima iNOS e da Smad2P em macrófagos murinos
31 ativados e infectados com as subpopulações de *T. gondii*.

32 Macrófagos plaqueados sobre lamínula em placas de 24 poços e
33 infectados nos tempos de 2, 24 e 48 h foram lavados, fixados em
34 paraformaldeído 4% em PBS, lavados novamente e incubados em 0,5% de

1 Triton-x 100 (Sigma) em tampão fosfato salino (PBS). As lamínulas com as
2 células foram incubadas com 10 mM de cloreto de amônio em PBS e lavadas
3 em PBS contendo 3% de BSA (PBS-BSA). As células foram incubadas por 1 h
4 com anticorpo policlonal de camundongo contra *T. gondii* (soro de
5 camundongos cronicamente infectados, 1:3000), lavadas com PBS-BSA e
6 incubadas por 1 h com anticorpo policlonal de coelho anti-NOS2 (sc-650, Santa
7 Cruz Biotechnolgy) ou com anticorpo policlonal de coelho anti- Smad2P (#
8 3108, Cell Signaling Techonolgy) diluído em PBS-BSA 1:100 ou 1:50,
9 respectivamente. Células foram lavadas com PBS e com PBS-BSA, incubadas
10 por 1 h com anticorpo secundário contra camundongo marcado com TRICT
11 diluído 1:400 e 1 h com anticorpo secundário contra coelho marcado com Alexa
12 488 diluído 1:100 em PBS-BSA. As células foram lavadas com PBS e as
13 lamínulas montadas em ProLong Gold com DAPI (Life Technologies).

14 O material foi observado em microscópio Zeiss Axioplan equipado com
15 iluminação epifluorescente e lâmpada de mercúrio HBO100. O total de 100
16 células por lamínula ($n = 3$) foi quantificado nos cinco grupos de infecção (com
17 população total PS^{+/+}, subpopulações PS⁺, PS⁺ tratada com 0,5 mM de DIDS,
18 PS⁻ e PS⁻ tratada com 0,5 mM de DIDS). As categorias contadas adotaram os
19 seguintes critérios para as marcações com iNOS: a) macrófagos infectados
20 positivos para iNOS, b) macrófagos infectados negativos para iNOS, c)
21 macrófagos não infectados positivos para iNOS, d) macrófagos não infectados
22 negativos para iNOS. As categorias contadas nas marcações com Smad2P
23 foram: a) macrófagos infectados positivos para Smad2P, b) macrófagos
24 infectados negativos para Smad2P, c) macrófagos não infectados positivos
25 para Smad2P, d) macrófagos não infectados negativos para Smad2P. As
26 imagens obtidas foram tratadas com Adobe Photoshop 6.0.

27

28 4.7 Análise dos dados

29

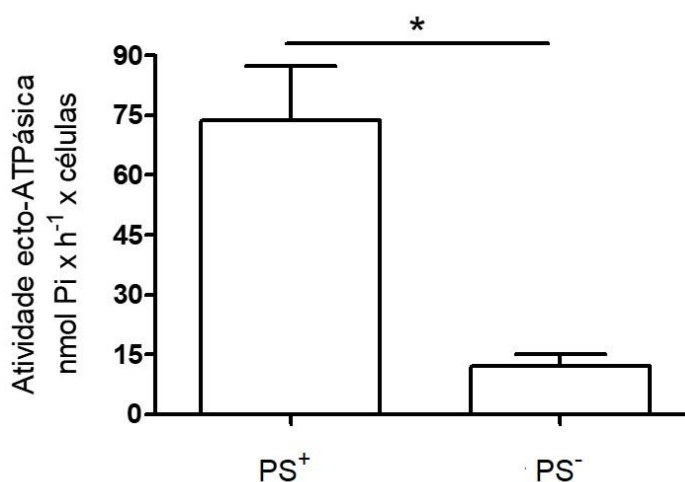
30 Os dados obtidos resultaram de no mínimo 3 repetições experimentais.
31 Foram calculadas médias e desvios padrões das médias de cada repetição. A
32 estatística foi desenvolvida no programa GraphPad Prism (versão 5.01). As
33 análises estatísticas para quantificação da atividade ecto-ATPásica foram
34 realizadas em Teste *t* de Student. Os valores obtidos das dosagens de NO e

1 contagens de células imunomarcadas com anti Smad2P foram analisadas pelo
 2 teste One-way ANOVA. Os dados das contagens de células com
 3 imunomarcação para iNOS foram analisadas pelo teste Two-way ANOVA.

6 5 Resultados

8 5.1 Atividade ecto-ATPásica em subpopulações de PS de *Toxoplasma* 9 *gondii*

11 Após a separação das subpopulações de PS de *T. gondii*, verificou-se
 12 que a subpopulação PS⁺ exibiu 6 vezes mais atividade ecto-ATPásica que a
 13 subpopulação PS⁻ de *T. gondii* (Figura 9).

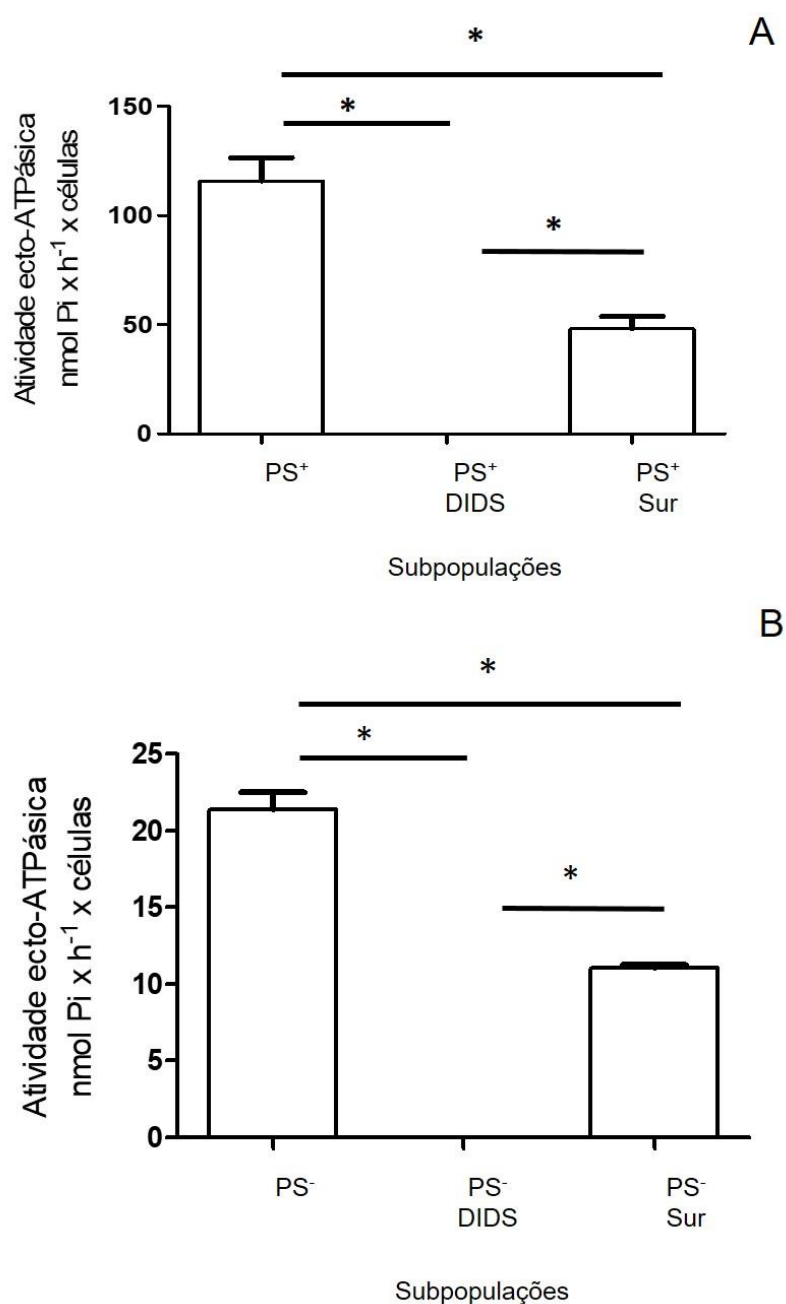


14
 15 Figura 9 – Atividade ecto-ATPásica de subpopulação de *Toxoplasma gondii*
 16 que expõe (PS⁺) ou não (PS⁻) a fosfatidilserina. * $P \leq 0,05$ (teste *t* de Student);
 17 média e DP de 3 experimentos independentes.

19 5.2 Efeito dos inibidores DIDS e Suramina na atividade ecto-ATPásica de 20 subpopulações de PS de *Toxoplasma gondii*

22 O tratamento das subpopulações PS isoladas de *T. gondii* com ambos
 23 inibidores de atividade ecto-ATPásica, DIDS ou Suramina, acarretou em
 24 diminuição significativa da atividade enzimática tanto na subpopulação PS⁺ de
 25 *T. gondii* (Figura 10 A) quanto na subpopulação PS⁻ (Figura 10 B), comparando
 26 com as subpopulações não tratadas.

1 A figura 10 mostra também que o tratamento com DIDS teve maior
 2 eficiência na inibição enzimática nas duas subpopulações de PS quando
 3 comparado ao tratamento com Suramina.



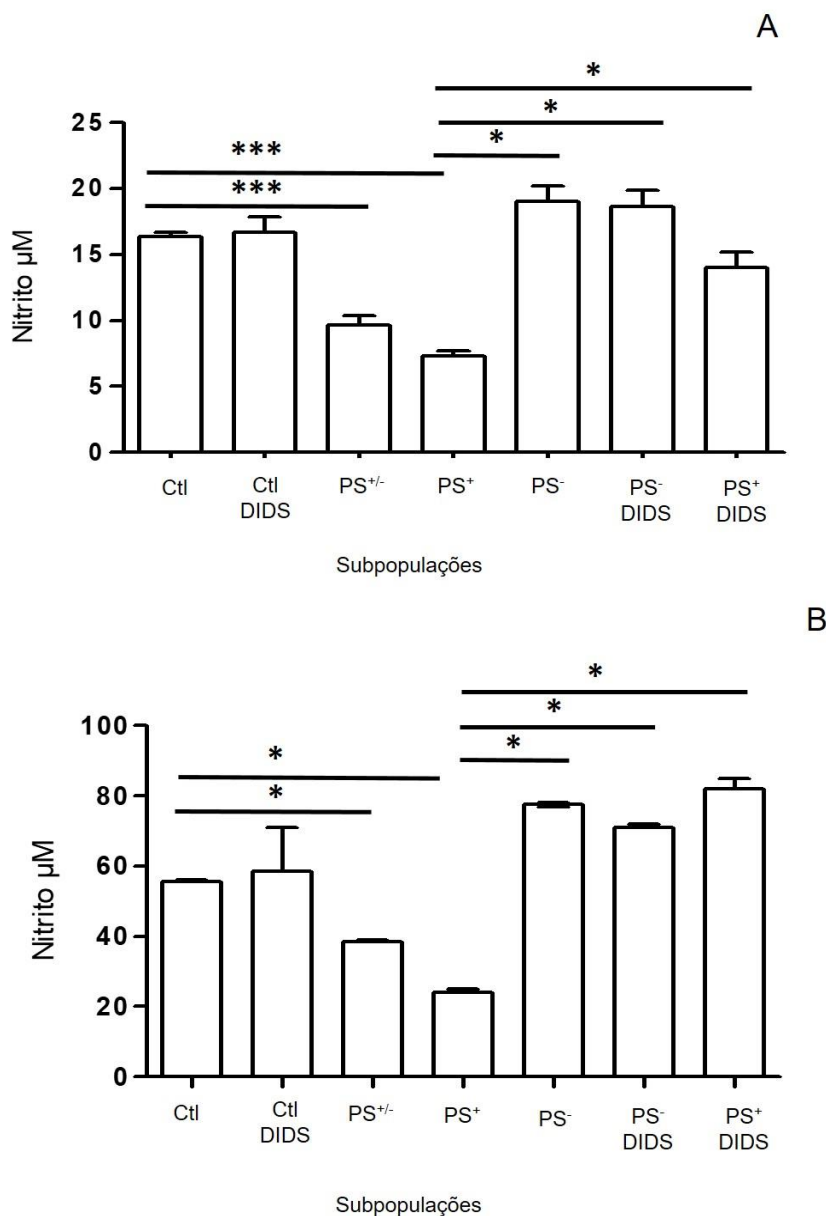
4
 5 Figura 10 – Atividade ecto-ATPásica de subpopulação de *Toxoplasma gondii*
 6 que expõe (PS⁺) (A) ou não expõe (PS⁻) (B) a fosfatidilserina, na presença ou
 7 ausência de inibidores da atividade ecto-ATPásica DIDS ou Suramina (Sur).
 8 * $P \leq 0,05$ (One-way ANOVA); média e DP de 3 experimentos independentes.

1 5.3 Produção de nitrito de macrófagos ativados e infectados com
2 subpopulações de PS de *Toxoplasma gondii* tratadas ou não com os
3 inibidores DIDS e Suramina

4

5 Houve redução da produção de nitrito de macrófagos ativados infectados
6 com a população PS^{+/-} e a subpopulação PS⁺ após 24 e 48 h de interação
7 (Figura 11). O tratamento da subpopulação PS⁺ com 0,5 mM de DIDS reverteu
8 significativamente esta inibição em 24 h de interação (Figura 11 A), alcançando
9 nível de produção ainda maior após 48 h (Figura 11 B).

10 O tratamento da subpopulação PS⁺ com 1 mM de DIDS, em 24 e 48 h,
11 também foi capaz de reverter a inibição da produção de nitrito dos macrófagos
12 infectados (dado não mostrado). Macrófagos infectados com subpopulação PS⁻
13 tratada ou não com 0,5 mM de DIDS produziram altas taxas de nitrito em 24
14 (Figura 11 A) e 48 h (Figura 11 B). Macrófagos murinos ativados não infectados
15 e tratados com 0,5 mM de DIDS não exibiram alterações no nível de produção
16 de nitrito (Figura 11).



1

2 Figura 11 – Produção de nitrito por macrófagos murinos ativados após 24 (A)
 3 ou 48 h (B) de infecção com população total de *Toxoplasma gondii* (PS^{+/-}),
 4 subpopulação que expõe fosfatidilserina (PS⁺), subpopulação que não expõe
 5 (PS⁻) e subpopulações tratadas com 0,5 mM do inibidor da atividade ecto-
 6 ATPásica DIDS (PS⁺ DIDS / PS⁻ DIDS). * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ (One-way
 7 ANOVA); média e DP de 3 experimentos independentes.

8

9

10

11

12

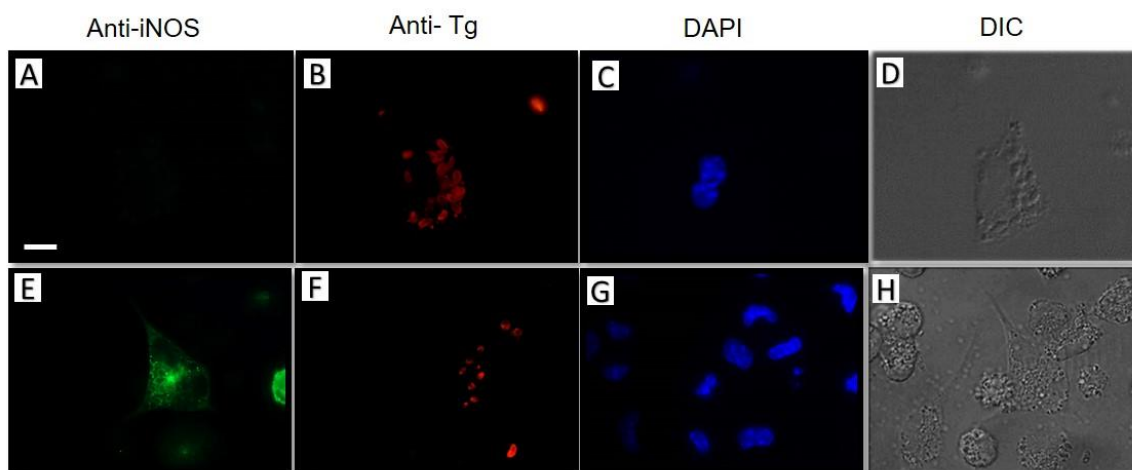
13

1 5.4 Imunomarcção da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida em macrófagos
 2 ativados e infectados com subpopulações PS de *Toxoplasma gondii*.

3

4 Macrófagos infectados com a subpopulação PS⁺ (tratada ou não com
 5 DIDS) expressaram ou não iNOS citoplasmática (Figura 12).

6

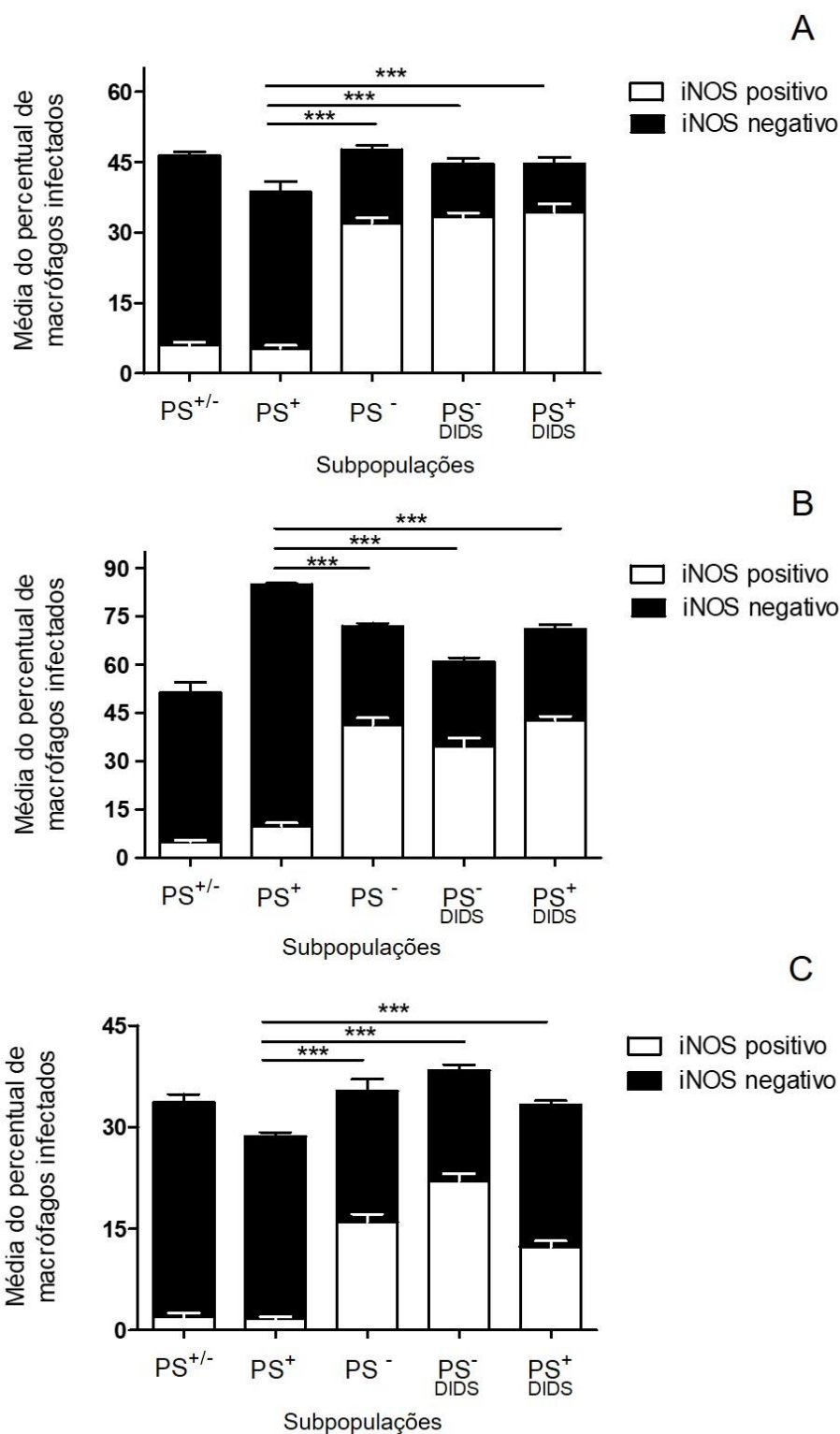


7

8 Figura 12 – Imagens representativas de macrófagos (núcleo marcado por DAPI
 9 - azul) negativos ou positivos para iNOS (verde) infectados com subpopulações
 10 de *Toxoplasma gondii* (vermelho) por 24 h. Células visualizadas por
 11 microscopia de fluorescência. A-D) Macrófago negativo para iNOS após
 12 infecção com subpopulação PS⁺. E-H) Macrófago positivo para iNOS após
 13 infecção com subpopulação PS⁺ tratado com 0,5 mM do inibidor da atividade
 14 ecto-ATPásica DIDS. Barra 10 µm.

15

16 A quantificação de macrófagos infectados por 2 (Figura 13 A), 24 (Figura
 17 13 B) e 48 h (Figura 13 C) mostra menor porcentagem de células hospedeiras
 18 expressando iNOS após interação com a população PS^{+/-} e subpopulação PS⁺.
 19 O tratamento da subpopulação PS⁺ com DIDS elevou significativamente o
 20 percentual de macrófagos infectados e positivos para iNOS, assemelhando-o a
 21 infecção com a subpopulação PS⁻ (Figura 13).



1

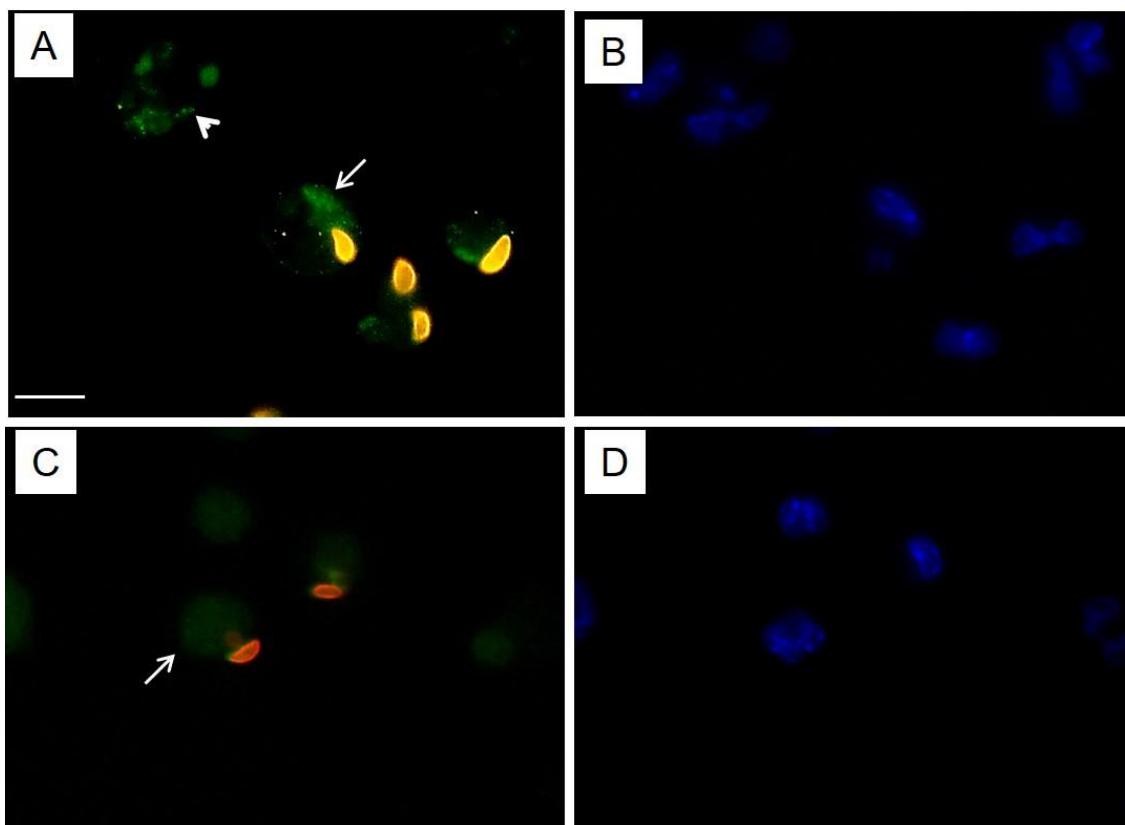
2 Figure 13 – Média do percentual de macrófagos murinos ativados e infectados,
 3 positivos ou negativos para iNOS após 2 (A), 24 (B) ou 48 h (C) de interação
 4 com população total de *Toxoplasma gondii* (PS^{+/-}), subpopulação que expõe
 5 fosfatidilserina (PS⁺), subpopulação que não expõe fosfatidilserina (PS⁻), e
 6 subpopulações tratadas com inibidor da atividade ecto-ATPásica, DIDS (PS⁺
 7 DIDS / PS⁻ DIDS). *** $P \leq 0,001$ (Two-way ANOVA); média e DP de 3
 8 experimentos independentes.

1 5.5 Localização de Smad2 fosforilada em macrófagos ativados e infectados
 2 com subpopulações PS de *Toxoplasma gondii*.

3

4 Após interação com a subpopulação PS⁺ de *T. gondii*, macrófagos,
 5 infectados ou não, apresentaram núcleo positivo ou negativo para Smad2P
 6 (Figura 14).

7



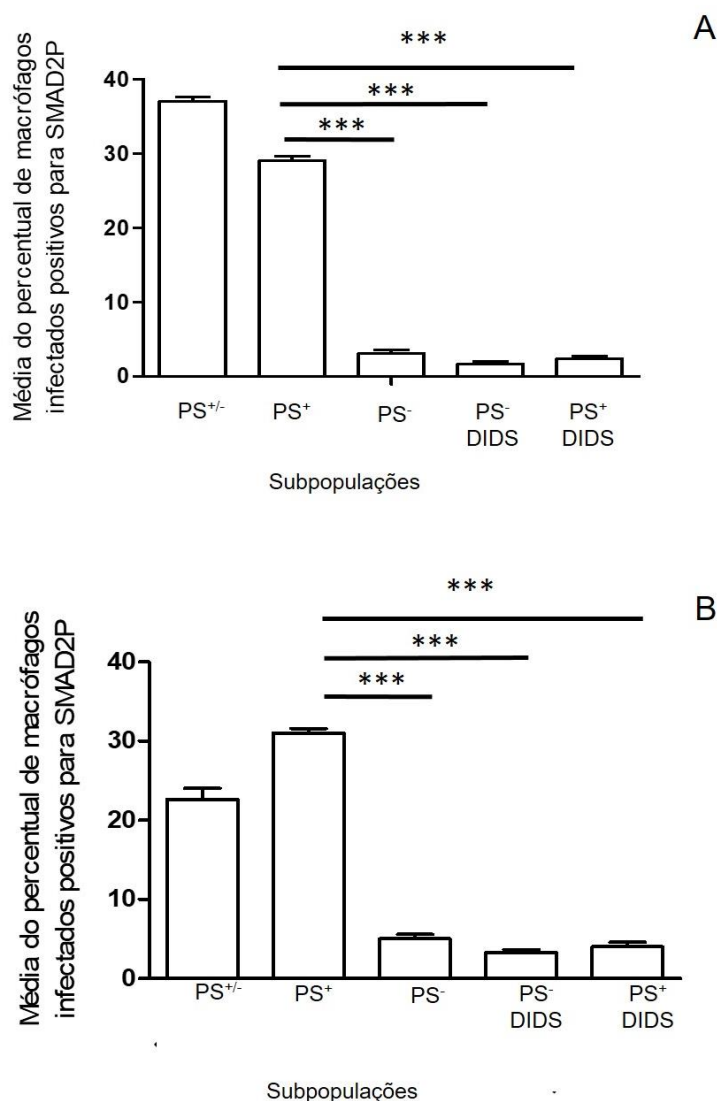
8

9 Figura 14 – Imagens representativas de macrófagos positivos ou negativos
 10 para SMAD2P (verde) infectados com subpopulação PS⁺ de *Toxoplasma gondii*
 11 (vermelho) por 24 h. A) Macrófago não infectado positivo para Smad2P nuclear
 12 (cabeça de seta). Macrófago infectado positivo para Smad2P nuclear (seta). B)
 13 Núcleos de macrófagos apresentados em “A” marcados com DAPI (azul). C)
 14 Macrófago infectado negativo para Smad2P nuclear (seta). D) Núcleos de
 15 macrófagos apresentados em “C” marcados com DAPI (azul). Barra 10 µm.

16

17 A análise da sinalização de TGF-β via expressão de Smad2P em
 18 macrófagos revelou alto percentual de células infectadas e positivas para
 19 Smad2P após 24 (Figura 15 A) e 48 h (Figure 15 B) de infecção com população
 20 PS^{+/-} e subpopulação PS⁺. O tratamento da subpopulação PS⁺ com DIDS
 21 reduziu o número de macrófagos infectados com expressão positiva para
 22 Smad2P. A infecção com subpopulação PS⁻ resultou em baixo percentual de

- 1 macrófagos infectados com Smad2P nuclear e o tratamento com DIDS não
 2 alterou esse percentual (Figure 15).



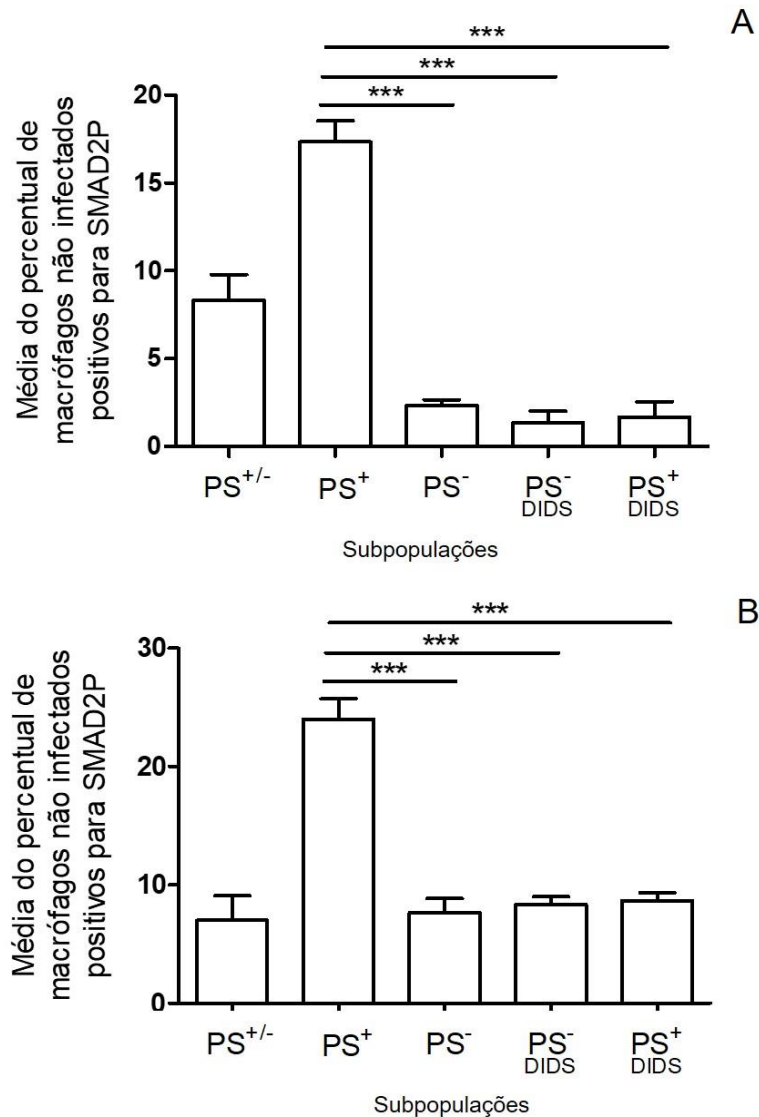
3

4 Figure 15 – Média do percentual de macrófagos murinos ativados, infectados e
 5 positivos para Smad2P após 24 (A) ou 48 h (B) de infecção com população
 6 total de *Toxoplasma gondii* (PS^{+/-}), subpopulação que expõe fosfatidilserina
 7 (PS⁺), subpopulação que não expõe fosfatidilserina (PS⁻), e subpopulações
 8 tratadas com inibidor da atividade ecto-ATPásica, DIDS (PS⁺ DIDS / PS⁻ DIDS).
 9 *** $P \leq 0,001$ (One-way ANOVA); média e DP de 3 experimentos independentes.

10

11 Mesmo após 24 e 48 h de interação, nem todos os macrófagos foram
 12 infectados por taquizoítos. A figura 15 apresenta o percentual de macrófagos
 13 infectados e positivos para Smad2P. A análise das células não infectadas
 14 mostrou maior percentual de macrófagos positivos para Smad2P após 24
 15 (Figura 16 A) e 48 h (Figura 16 B) de interação com subpopulação PS⁺. A

- 1 infecção com subpopulação PS⁻ ou subpopulações tratadas com DIDS resultou
 2 em baixo percentual de macrófagos com Smad2P nuclear (Figura 16).



- 3
 4 Figure 16 – Média do percentual de macrófagos murinos ativados, não
 5 infectados e positivos para Smad2P após 24 ou 48 h de infecção com
 6 população total de *Toxoplasma gondii* (PS^{+/-}), subpopulação que expõe
 7 fosfatidilserina (PS⁺), subpopulação que não expõe fosfatidilserina (PS⁻), e
 8 subpopulações tratadas com inibidor da atividade ecto-ATPásica DIDS (PS⁺
 9 DIDS / PS⁻ DIDS). *** $P \leq 0,001$ (Two-way ANOVA); média e desvio de 3
 10 experimentos independentes.
 11

1 **6 Discussão**

2

3 Ectonucleotidases são enzimas capazes de clivar o Pi de nucleotídeos
4 de purina ou pirimidina. Fazem parte deste grupo enzimas solúveis que podem
5 ser secretadas e enzimas de membrana com o sítio catalítico extracelular. As
6 E-NTPDases são ectonucleotidases de membrana que têm como substrato
7 nucleotídeos tri e difosfatados. Dentre os membros descritos está a E-
8 NTPDase 1 ou Ecto-ATPase capaz de clivar ATP e ADP a AMP (Zimmermann,
9 2001). O AMP gerado é alvo de 5'-NT (CD73), sendo convertido a Ado (Colgan
10 *et al.*, 2006). Esta sequência de conversões é importante para o controle da
11 resposta imune via sinalização purinérgica, pois nucleotídeos extracelulares
12 fortalecem a resposta pró-inflamatória. Em contrapartida, os nucleosídeos
13 desencadeiam respostas anti-inflamatórias (Bours *et al.*, 2006). Enzimas com
14 atividade hidrolítica similar as E-NTPDases foram descritas em *T. gondii* (Asai
15 *et al.*, 1983). Com alta eficiência na hidrólise de ATP, sua localização foi
16 associada aos grânulos densos (Sibley *et al.*, 1994), cujo conteúdo é liberado
17 pelo parasito após a formação do VP (Carruthers, 2002). Acredita-se que estas
18 formas secretadas de NTPDases em *T. gondii* hidrolisam nucleotídeos
19 intracelulares do hospedeiro para o processo de recuperação de purinas, uma
20 vez que este parasito não realiza a síntese de nucleotídeos *de novo* (Sibley *et*
21 *al.*, 1994). A descoberta de atividade ecto-ATPásica na superfície do parasito,
22 bem como, sua associação a cepas virulentas têm sugerido que estas enzimas
23 possam desempenhar um papel além da via de recuperação de purinas (Asai
24 *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 2001). No entanto, dados recentes apontam que
25 essa enzima não tem importância na virulência de cepas em infecções *in vivo*
26 de camundongos (Olias e Sibley, 2016). O presente estudo correlacionou a
27 atividade de ecto-ATPases da superfície de *T. gondii* com subpopulações de
28 PS que, a princípio, são responsáveis pelo controle da produção de NO em
29 macrófagos ativados após infecção (Seabra *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*,
30 2011).

31 Diversos parasitos possuem atividade ecto-ATPásica em sua superfície
32 (Sansom, 2008), a qual pode ser medida em parasitos vivos (Meyer-
33 Fernandes *et al.*, 1997, Berredo-Pinho *et al.*, 2001, Kikuchi *et al.*, 2001;
34 Bisaggio *et al.*, 2003; Marques-da-Silva *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2015).

1 Segundo resultados de Kikuchi *et al.* (2001) *T. gondii* possui atividade ecto-
2 ATPásica de superfície. Estes dados foram confirmados neste estudo através
3 da quantificação da atividade enzimática em subpopulações de *T. gondii*.
4 Ambas subpopulações, PS⁺ e PS⁻, demonstraram atividade hidrolítica para
5 ATP. Entretanto, a atividade de hidrólise foi maior na subpopulação PS⁺. Isso
6 indica que a atividade dessa enzima se relaciona com a exposição de PS de
7 taquizoítos, podendo explicar por que a infecção de macrófagos ativados com a
8 subpopulação PS⁺ resulta em menor produção de NO. Diferença na
9 capacidade de hidrólise de ATP é descrita em taquizoítos de diferentes cepas
10 de *T. gondii*. Cepas virulentas possuem isoforma de NTPase com alta
11 seletividade para hidrólise de ATP, ao contrário de cepas menos virulentas
12 (Asai *et al.*, 1995). Espécies do gênero *Leishmania* também exibem diferenças
13 na atividade ecto-ATPásica. *Leishmania amazonensis* demonstra maior nível
14 de hidrólise de ATP em relação a outras espécies que causam lesões menores
15 (Marques-da-Silva *et al.*, 2008). Dessa forma, os dados obtidos sugerem que
16 essa diferença na atividade ecto-ATPásica das subpopulações de PS de *T.*
17 *gondii* pode estar relacionada à subpopulação mais infectiva, já que taquizoítos
18 PS⁺ são descritos pela maior capacidade de invasão e inibição da produção de
19 NO (Dos Santos *et al.*, 2011), como confirmado neste estudo.

20 O tratamento com DIDS e suramina inibiu a atividade ecto-ATPásica nas
21 duas subpopulações de PS. Estas moléculas são inibidores não competitivos
22 de receptores purinérgicos do tipo P2 e ecto-ATPases (Beukers *et al.*, 1995;
23 Bültmann *et al.*, 1996). Em tripomastigotas de *T. cruzi* 0,5 mM de suramina inibe
24 80% da atividade ecto-ATPásica (Bisaggio *et al.*, 2003). A concentração de 0,5
25 mM de DIDS inibe quase totalmente a atividade ecto-ATPásica em
26 promastigotas de *L. tropica* (Meyer-Fernandes *et al.*, 1997). Em *L.*
27 *amazonensis* a resposta de inibição com DIDS e suramina é dose dependente,
28 sendo 0,5 mM capaz de inibir mais de 60% da atividade ecto-ATPásica
29 (Berredo-Pinho *et al.*, 2001). Os dados obtidos aqui indicam que DIDS e
30 suramina podem ser utilizados como inibidores de ecto-ATPases da superfície
31 de *T. gondii*.

32 DIDS demonstrou maior eficiência na inibição da atividade ecto-
33 ATPásica em relação à suramina. Uma explicação para essa diferença
34 encontrada entre os inibidores utilizados é a possibilidade destas ecto-ATPases

1 de superfície de *T. gondii* serem constituídas por uma isoforma mais sensível a
2 ação de DIDS, exigindo concentrações maiores para inibição com suramina. As
3 isoformas de E-NTPDases 1, 2, 3 humanas são mais sensíveis à inibição por
4 suramina do que a NTPDase 8, e E-NTPDase 1 de camundongos que
5 demonstra insensibilidade a este inibidor (Munkonda *et al.*, 2007). Outras
6 diferenças na resposta ao inibidor, em relação ao tipo celular, são relatadas,
7 como por exemplo, em eritrócitos humanos suramina (0,1 mM) é capaz de inibir
8 cerca de 50% da atividade ecto-ATPásica (Beukers *et al.*, 1995). Em
9 contrapartida, células da bexiga, derivadas de cobaia (*Cavia porcellus*),
10 tratadas com 10 mM de suramina têm apenas 30% de inibição da atividade
11 (Hourani e Chown, 1989). Portanto, um mesmo inibidor pode gerar diferentes
12 respostas dependendo do tipo celular.

13 Como esperado, a infecção com população PS^{+/-} de *T. gondii* levou à
14 redução nos níveis de NO, com elevado percentual de macrófagos negativos
15 para iNOS e positivos para Smad2P nuclear. Sabe-se que *T. gondii* é capaz de
16 inibir a produção de NO em macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002; Lüder *et al.*,
17 2003; Seabra *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*, 2011). A infecção induz a
18 degradação da iNOS citoplasmática via proteossomo (Padrão *et al.*, 2014).
19 Como demonstrado por Dos Santos e colaboradores (2011) e confirmado nos
20 resultados apresentados aqui, a infecção de macrófagos com subpopulação
21 PS⁺ resultou em baixa produção de NO após a interação. Além disso, houve
22 alto percentual de macrófagos negativos para iNOS e positivos para Smad2P
23 nuclear. Sabe-se que a PS exposta por *T. gondii* induz liberação de TGF-β1 em
24 macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2004). A sinalização por TGF-β1 envolve
25 a translocação de Smad2P para o núcleo (Nakao *et al.*, 1997; Massagué,
26 2012). Como resultado tem-se a inibição da expressão de iNOS (Seabra *et al.*,
27 2002). Dessa forma, a presença de Smad2P nuclear, nos macrófagos
28 infectados com taquizoítos PS^{+/-} e PS⁺, explica os resultados de inibição de NO
29 pela via de sinalização de TGF-β1. O alto percentual de macrófagos não
30 infectados e positivos para Smad2P na infecção com subpopulação PS⁺ é um
31 reflexo da sinalização parácrina exercida pelo TGF-β (Massagué, 2012). Em
32 contraste, taquizoítos PS⁻ não conseguiram inibir a produção de NO em
33 macrófagos, confirmado pela alta taxa de macrófagos positivos para iNOS e
34 negativos para Smad2P nuclear. Esses dados confirmam que somente a

1 subpopulação PS⁺ inibe NO (Dos Santos *et al.*, 2011) e que o TGF- β 1 está
2 envolvido nesse fenômeno (Seabra *et al.*, 2004).

3 Taquizoítos PS⁺ tratados com DIDS não foram capazes de reverter a
4 inibição da produção de NO nos macrófagos, sugerindo envolvimento destas
5 ectoATPases nesse mecanismo de inibição. Resultado similar foi apresentado
6 por Gomes *et al.* (2015), no qual ecto-ATPases de superfície em *L.*
7 *amazonensis* reduzem os níveis de NO em macrófagos J774 ativados e o
8 tratamento com DIDS reverte essa inibição. Além disso, nos resultados obtidos
9 os macrófagos infectados apresentavam iNOS citoplasmática e ausência de
10 Smad2P nuclear. A expressão de iNOS pode ser induzida pela ativação de
11 STAT 1 via IFN- γ (Bogdan, 2015). Taquizoítos de *T. gondii* são capazes de
12 bloquear a atuação de STAT 1 (Olias *et al.*, 2016), entretanto as NTPases de *T.*
13 *gondii* não estão envolvidas nesse processo (Olias e Sibley, 2016). Os
14 resultados apresentados aqui sugerem que as NTPases possam atuar na
15 inibição da produção de NO via sinalização de TGF- β . Ecto-ATPase na
16 superfície de parasitos está relacionada à hidrólise de ATP extracelular para
17 AMP (Meyer- Fernandes *et al.*, 1997; Kikuchi *et al.*, 2001; Bisaggio *et al.*, 2003;
18 Meyer- Fernandes *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2006; Marques-da-Silva *et al.*,
19 2008; Gomes *et al.*, 2015). Este AMP é convertido em Ado por 5'-NT (CD 73)
20 (Colgan *et al.*, 2006). Ado é reconhecida por receptores A_{2A} e A_{2B} reduzindo a
21 produção de citocinas pró-inflamatórias e a produção de NO (Haskó *et al.*,
22 1996). Camundongos CD73^{-/-} infectados apresentam altos níveis de NO e TNF-
23 α em exsudato peritoneal (Mahamed *et al.*, 2015). É possível que a
24 subpopulação PS⁺ de *T. gondii* utilize a conversão de ATP em Ado para
25 influenciar o perfil inflamatório de macrófagos, reduzindo a expressão de iNOS
26 com consequente inibição da produção de NO. O elevado nível de NO e iNOS
27 em macrófagos infectados com subpopulação PS⁺ tratada com DIDS foi
28 mantido após 48 h de interação. Bültmann *et al.* (1996) relata uma associação
29 parcialmente reversível de DIDS em ecto-ATPases. Possivelmente depois do
30 tratamento dos taquizoítos com DIDS a atividade enzimática não foi totalmente
31 recuperada, mesmo após a lavagem das células tratadas.

32 Embora atividade ecto-ATPásica também tenha sido detectada na
33 subpopulação PS⁻, o tratamento com DIDS não gerou diferença na produção
34 de NO em comparação à infecção com taquizoítos PS⁻ não tratados. Esta

1 subpopulação já é descrita por sua incapacidade de inibir a produção de NO
2 em macrófagos (Dos Santos *et al.*, 2011). Considerando que taquizoítos PS⁻
3 apresentaram atividade ecto-ATPásica 6 vezes menor do que a subpopulação
4 PS⁺, pode-se sugerir que a atividade enzimática nesta subpopulação não é
5 suficiente para reduzir os níveis de NO produzido por macrófagos. Dos Santos
6 *et al.* (2011) sugerem que essa subpopulação é importante para a
7 sobrevivência do hospedeiro, pois permite a ativação do sistema imunológico
8 contra balanceando a subpopulação PS⁺ que induz desativação de
9 macrófagos, como inibição da produção de NO, confirmado neste estudo.
10 Macrófagos ativado com LPS liberam ATP no meio extracelular (Sakaki *et al.*,
11 2013) o que sustenta a reação inflamatória de tecidos onde estão presentes. A
12 ativação de receptores P2X₇ em macrófagos por ATP extracelular pode ser um
13 importante mecanismo para eliminação de parasitos (Chaves *et al.*, 2009;
14 Corrêa *et al.*, 2010). O tratamento de macrófagos murinos com ATP inibe a
15 carga de *T. gondii* através do processo de entrada que ocorre por fagocitose de
16 taquizoítos, os levando a morte (Corrêa *et al.*, 2010). Portanto, é possível que a
17 subpopulação PS⁻ não altere os níveis de ATP extracelular e entre por
18 fagocitose, sendo destruída pelos macrófagos, e assim contra balanceando a
19 capacidade anti-inflamatória da subpopulação PS⁺. Ademais, ATP extracelular
20 ativa receptores P2 e induz acúmulo de Ca⁺² citoplasmático (Idzko *et al.*, 2014).
21 O Ca⁺² ativa proteínas cinases dependente de Ca⁺²/calmodulina capazes de
22 impedir a atuação de Smad2 no núcleo, mesmo após ativação do receptor de
23 TGF-β (Wicks *et al.*, 2000). Este fato justifica a baixa sinalização via Smad2P
24 em macrófagos infectados com subpopulação PS⁻ e PS⁺ tratados com DIDS.
25 Analisando a correlação entre ecto-ATPases e subpopulações de *T. gondii*, é
26 possível que estas enzimas atuem, indiretamente, facilitando a inativação de
27 macrófagos, já que a PS induz redução na produção de NO via liberação de
28 TGF-β (Seabra *et al.*, 2004) e altos níveis de ATP impediriam a atuação de
29 Smad2P (Wicks *et al.*, 2000).

30 Os resultados discutidos apresentam fortes evidências do papel
31 imunomodulador que as ecto-ATPases de *T. gondii* podem desempenhar na
32 inibição da produção de NO causada pela subpopulação PS⁺, contribuindo para
33 o sucesso da infecção. Contudo outros estudos devem ser desenvolvidos para
34 esclarecer essa ideia.

1 7 Conclusões

2

3 ➤ Taquizoítos da subpopulação PS⁺ de *T. gondii* possuem maior atividade
4 ecto-ATPásica de superfície do que taquizoítos da subpopulação PS⁻.

5 ➤ O inibidor DIDS foi mais eficiente no bloqueio da atividade de ecto-
6 ATPases de superfície de *T. gondii* do que a Suramina.

7 ➤ O tratamento da subpopulação PS⁺ com DIDS gerou redução da
8 capacidade de inibir NO produzido por macrófagos, com presença de
9 iNOS citoplasmática e menor localização de Smad2P nuclear em
10 macrófagos.

11 ➤ Ecto-ATPases de superfície na subpopulação PS⁻ não estão envolvidas
12 na inibição da produção de NO em macrófagos.

13

8 Referências Bibliográficas

ASAI, T. *et al.* Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 19, p. 11391-11397, May 1995.

ASAI, T.; O'SULLIVAN, W. J.; TATIBANA, M. A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*: Purification, some properties, and activation by thiol compounds. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 11, p. 6816-6822, June 1983.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al.* Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 55-62, Jan. 2003.

BARCINSKI, M. A. *et al.* The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, p. 6-7, June 2003.

BARRAL-NETTO, M. *et al.* Transformation growth Factor- β in Leishmania infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 545-548, July 1992.

BARROS, F. S. *et al.* Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 375, n. 2, p. 304-314, Mar. 2000.

BATTASTINI, A. M. O.; ZANIN, R. F.; BRAGANHOL, E. Recentes avanços no estudo das enzimas que hidrolisam o ATP extracelular. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 26-28, Jan. 2011.

BERMUDES, D. *et al.* Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 46, p. 29252-29260, Nov. 1994.

BERMUDEZ, L. E.; COVARO, G.; REMINGTON, J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 10, p. 4126-30, Oct. 1993.

BERRÊDO-PINHO, M. *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 391, p. 16-24, July 2001.

BEUKERS, M. W. *et al.* Suramin analogs, divalent cations and ATP γ S as inhibitors of ecto-ATPase. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 351, n. 5, p. 523-528, May 1995.

BIEDERBICK, A.; ROSE, S.; ELSASSER, H. P. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 2473-2484, Aug. 1999.

BISAGGIO, D. F. *et al.* Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitol. Res.**, v. 91, p. 273-282, Aug. 2003.

- 1 BISAGGIO, D. F. *et al.* Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and
2 its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitol. Res.**, v. 91, p. 273-282,
3 2003.
- 4
- 5 BLISS, S. K. *et al.* Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to
6 impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4898-
7 905, Aug. 2001.
- 8
- 9 BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends**
10 **in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161-78, Mar. 2015.
- 11
- 12 BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii*
13 is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide
14 in triggering stage conversion. **Infection and immunity**, v. 62, n. 5, p. 1761-7, May
15 1994.
- 16
- 17 BOTTEREL, F. *et al.* Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft,
18 after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. **J. Clin.**
19 **Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1648-50. May 2002.
- 20
- 21 BOURS, M. J. L. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous
22 signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.
23 112, n. 2, p. 358-404, Nov. 2006.
- 24
- 25 BRAUN, N. *et al.* Sequencing, functional expression and characterization of rat
26 NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside
27 triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochemical Journal**, v. 351, p. 639-647,
28 Nov. 2000.
- 29
- 30 BUELL, G. *et al.* Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal
31 antibody. **Blood**, v. 92, n. 10, p. 3521–3528, Nov. 1998.
- 32
- 33 BÜLTMANN, R. *et al.* P2-purinoceptor antagonists: I. Blockade of P2-purinoceptor
34 subtypes and ecto-nucleotidases by small aromatic isothiocyanato-sulphonates.
35 **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 354, n. 4, p. 481–490, Oct.
36 1996.
- 37
- 38 BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: BOLIS,
39 L.; STRAUB, R. W. (Editors). **Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: a**
40 **multidisciplinary approach**. New York: Raven Press, p. 107–118, 1978.
- 41
- 42 BUTCHER, B. A. *et al.* Cutting edge: IL-10-independent STAT3 activation by
43 *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages.
44 **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3148-3152, Mar. 2005.
- 45
- 46 BUTCHER, B. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and
47 STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLoS**
48 **Pathogens**, e1002236, Sept. 2011.
- 49
- 50 BUTCHER, B. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine
51 induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the
52 transcription factor NF-kB. **J. Immunol.**, v. 167, n. 4, p. 2193-2201, Aug. 2001.
- 53
- 54 BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Mechanism of entry determines the ability of
55 *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infect.**

- 1 **Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5216-24, Sept. 2002.
- 2 CABALLERO-ORTEGA, H. *et al.* Seroprevalence and national distribution of human
3 toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys.
4 **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 11, p. 653-9, Nov. 2012.
- 5
- 6 CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma*
7 *gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 111-22, Feb. 2002.
- 8
- 9 CENCI-GOGA, B. T. *et al.* Toxoplasma in animals, food, and humans: an old parasite
10 of new concern. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 8, n. 7, p. 751-62, July 2011.
- 11
- 12 CHAVES, S. P. *et al.* Modulation of P2X₇ purinergic receptor in macrophages by
13 *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. **Microbes and Infection**,
14 v. 11, n. 10-11, p. 842-9, Sept. 2009.
- 15
- 16 CHEKENI, F. B. *et al.* Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and
17 membrane permeability during apoptosis. **Nature**, v. 467, n. 7317, p. 863–867, Oct.
18 2010.
- 19
- 20 CHEN, B. C.; LEE, C-M.; LIN, W-W. Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and
21 reactive blue 2 in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages.
22 **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 1628–1634, 1996.
- 23
- 24 COLGAN, S. P. *et al.* Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic**
25 **Signalling**, v. 2, n. 2, p. 351-360, June 2006.
- 26
- 27 CORREA, G. *et al.* Activation of the P2X₇ receptor triggers the elimination of
28 *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes and Infection**,
29 v. 12, n. 6, p. 497–504, June 2010.
- 30
- 31 CRANE, J. K. *et al.* Release of ATP during host cell killing by enteropathogenic *E. coli*
32 and its role as a secretory mediator. **Am. J. Physiology-Gastrointestinal Liver**
33 **Physiol.**, v. 283, p. 74–86, July 2002.
- 34
- 35 CRONSTEIN, B. N. *et al.* Adenosine: A physiological modulator of superoxide anion
36 generation by human neutrophils. **J. Exp. Med.**, v.158, n. 4, p. 1160–77, Oct. 1983.
- 37
- 38 CRONSTEIN, B. N. *et al.* The adenosine/neutrophil paradox resolved: Human
39 neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂
40 generation, respectively. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 4, p. 1150–1157, Apr. 1990.
- 41
- 42 DA GAMA, L. M. *et al.* Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components,
43 modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages
44 infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 14, p. 1287-96, Nov.
45 2004.
- 46
- 47 DAMATTA, R. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion
48 mechanism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 29-33, Jan. 2007.
- 49
- 50 DARNELL, J. E. Jr. STATs and gene regulation. **Science**, p. 1630-5, Sept. 1997.
- 51
- 52 DE FREITAS BALANCO, J. M. *et al.* Apoptotic mimicry by an obligate intracellular
53 parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 23, p.
54 1870-1873, Nov. 2001.
- 55

- 1 DE SOUZA, M. C. *et al.* The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania*
2 *amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Trop.**, v. 115, n. 3,
3 p. 262-9, Sept. 2010b.
- 4
5 DE SOUZA, W. *et al.* Organização estrutural do Taquizoíto de *Toxoplasma Gondii*.
6 (Figura 1. Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*). **Scientia Med.**,
7 v. 20 p. 131-143, 2010a, il color.
- 8
9 DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated
10 immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 569-
11 88, Oct. 1998.
- 12
13 DENKERS, E.; SHER, A.; GAZZINELLI, R. T. CD8+ T-cell interactions with
14 *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class-I-restricted
15 recognition. **Res. Immunol.**, v. 144, p. 51-7, Jan. 1993.
- 16
17 DHUMNE, M. *et al.* National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in India. **J.**
18 **Parasitol.**, v. 93, n. 6, p. 1520-1, Dec. 2007.
- 19
20 DI VIRGILIO, F. *et al.* Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules
21 in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587-600, Feb. 2001.
- 22
23 DOS SANTOS, T. A. T. *et al.* Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is
24 fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of
25 the host. **PLoS One**, v. 6, n. 11, e27867, Nov. 2011.
- 26
27 DOYLE, A. G. *et al.* Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in
28 vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n.
29 6, p. 1441-5, June 1994.
- 30
31 DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28,
32 n. 7, p. 1019-24, July 1998.
- 33
34 DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence,
35 high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424,
36 Sept. 2012.
- 37
38 DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J.**
39 **Parasitol.**, v. 39, p. 877-882, 2009.
- 40
41 DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **The Journal of**
42 **Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, Nov. 2008. Disponível em:
43 <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x/abstract;jsessionid=5EFBE4F1ED792BAB9704152E0F08E3BF.f04t03)
44 [7408.2008.00345.x/abstract;jsessionid=5EFBE4F1ED792BAB9704152E0F08E3BF.f04](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x/abstract;jsessionid=5EFBE4F1ED792BAB9704152E0F08E3BF.f04t03)
45 [t03](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x/abstract;jsessionid=5EFBE4F1ED792BAB9704152E0F08E3BF.f04t03)>. Acesso em: 20 Maio 2017.
- 46
47 DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, FL
48 33431: Ed. CRC Press Inc., 1988.
- 49
50 DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J. Eukar.**
51 **Microbiol.**, v. 19, p. 155-77, Feb. 1972.
- 52
53 DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii*
54 tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.
55 **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-299, Apr. 1998.

- 1
2 DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form
3 of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, v. 56, n. 3, p. 447-56, June 1970.
4
5 DUBREMETZ, J. F.; FERGUSON, D. J. The role played by electron microscopy in
6 advancing our understanding of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexans. **Int. J.**
7 **Parasitol.**, v. 39, n. 8, p. 883-93, July 2009.
8
9 EDWARDS, J. P. *et al.* Biochemical and functional characterization of three activated
10 macrophage populations. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 6, p. 1298–1307, Dec. 2006.
11
12 ELTZSCHIG, H. K. *et al.* ATP release from activated neutrophils occurs via connexin
13 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. **Circ. Res.**, v. 99, n.
14 10, p. 1100–1108, Nov. 2006.
15
16 FADOK, V. A. *et al.* The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by
17 phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, v. 5, n. 7, p. 551-562, July 1998.
18
19 FERGUSON D. J. P.; DUBREMETZ, J. F. The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*.
20 **Toxoplasma gondii**, London, p. 19-48, 2007.
21
22 FERGUSON, D. J. *et al.* Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication
23 and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. **Acta**
24 **Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B. Microbiol. Immunol.**, v. 82,
25 n. 2, p. 167-81, Apr. 1974.
26
27 FERGUSON, D. J. P. *et al.* Enzymes of type II fatty acid synthesis and apicoplast
28 differentiation and division in *Eimeria tenella*. (Figura 9 – Diagram illustrating the
29 differences in the timing and location of nuclear division and daughter formation
30 associated with asexual development within the Apicomplexa). **Inter. J. Parsit.**, v. 37,
31 p. 33-51, Jan. 2007, il color.
32 FERRARI, D. *et al.* Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. (Figura 1. The
33 Purinergic Network). **Trends Immunol.**, v. 37, n. 6, p. 399-411, June 2016, il.
34
35 FIETTO, J. L. *et al.* Characterization and immunolocalization of an NTP
36 diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**,
37 v. 316, n. 2, p. 454-460, Apr. 2004.
38
39 FOTHERINGHAM, J. A., *et al.* Activation of adenosine receptors inhibits tumor
40 necrosis factor-alpha release by decreasing TNF-alpha mRNA stability and p38
41 activity. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 497, n. 1, p. 87–95, Aug. 2004.
42
43 FREDHOLM, B. B. *et al.* Nomenclature and Classification of Purinoceptors.
44 **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 2, p. 143-156, June 1994.
45
46 FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages
47 identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-6, Feb. 1970.
48
49 FROMONT, E. G.; RICHE, B.; RABILLOUD, M. *Toxoplasma* seroprevalence in a rural
50 population in France: detection of a household effect. **BMC Infectious Diseases**, v. 9,
51 p.76, May 2009.
52
53 GAZZINELLI, R. T. *et al.* Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent
54 induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-
55 cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, n. 13, p. 6115-9, July 1993.

- 1 GOLDSTEIN, E. J. C.; MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of
2 *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n.4, p. 554-
3 566, Aug. 2008.
- 4
5 GOMES, R. S. *et al.* E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase)
6 of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microbes and**
7 **Infection**, v. 17, n. 4, p. 295-303, Apr. 2015.
- 8
9 GOPAL, R.; BIRDSELL, D.; MONROY, F. P. Regulation of chemokine responses in
10 intestinal epithelial cells by stress and *Toxoplasma gondii* infection. **Parasite**
11 **Immunology**, v. 33, p. 12-24, Jan. 2011.
- 12
13 GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrite in biological fluids. **Anal**
14 **Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, Oct. 1982.
- 15
16 GREEN, L. C. *et al.* Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78,
17 n. 12, p. 7764-7768, Dec. 1981b.
- 18
19 GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree
20 and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, Apr. 1981a.
- 21
22 GRIFFITHS, R. J. *et al.* ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo.
23 **J. Immunol.**, v. 154, n. 6, p. 2821–2828, Mar. 1995.
- 24
25 GUILLERMO, L. V.; DAMATTA, R. A. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii*
26 infection of chicken macrophage cell lines. **Poult. Sci.**, v. 83, n. 5, p. 776-782, May
27 2004.
- 28
29 HASHIMOTO, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout
30 adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p.
31 792–804, Apr. 2013.
- 32
33 HASKÓ, G. *et al.* Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha,
34 and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **J.**
35 **Immunol.**, v. 157, n. 10, p. 4634–4640, Nov. 1996.
- 36
37 HASKÓ, G. *et al.* Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine
38 A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB J.**, v. 14, n. 13, p.
39 2065-2074, Oct. 2000.
- 40
41 HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of Inflammation by Adenosine. **Frontiers in**
42 **Immunology**, v. 4, p. 85, Apr. 2013.
- 43
44 HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention.
45 **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 10, p. 634-40, Oct. 2002.
- 46
47 HOURANI, S. M.; CHOWN, J. A. The effects of some possible inhibitors of
48 ectonucleotidases on the breakdown and pharmacological effects of ATP in the guinea-
49 pig urinary bladder. **Gen. Pharmacol.**, v. 20, n. 4, p. 413 416, 1989.
- 50
51 HU, Y. *et al.* Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and
52 inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. **J. Biol.**
53 **Chem.**, v. 273, n. 42, p. 27170-5, Oct. 1998.
- 54
55 HUTCHINS, A. P.; DIEZ, D.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10/STAT3-mediated

- 1 anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Brief. Funct.**
2 **Genom.**, v. 12, n. 6, p. 489-98, Aug. 2013.
- 3
4 IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signalling during
5 inflammation. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 310–317, May 2014.
- 6
7 JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. A survey of meat samples from
8 swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **J. Parasitol.**, v. 46,
9 p. 23-8, Feb. 1960.
- 10
11 JACOBSON, K. A. *et al.* Nucleotides acting at P2Y receptors: Connecting structure and
12 function. **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 220-230, Aug. 2015.
- 13
14 JENKINS, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the
15 blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284–1288,
16 June 2011.
- 17
18 JOYNSON, D. H. Epidemiology of toxoplasmosis in the UK. **Scand. J. Infect. Dis.**
19 **Suppl.**, v. 84, p. 65-69, 1992.
- 20
21 KAS-DEELEN, A. M. *et al.* Cytomegalovirus infection increases the expression and
22 activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73) on endothelial cells.
23 **FEBS Letters**, v. 491, p. 21–5, Feb. 2001.
- 24
25 KAWATE, T. *et al.* Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed
26 state. **Nature**, v. 460, n. 7255, p. 592-598, July 2009.
- 27
28 KHOA, N. D. *et al.* Inflammatory Cytokines Regulate Function and Expression of
29 Adenosine A2A Receptors in Human Monocytic THP-1 Cells. **J. Immunol.**, v. 167, n. 7,
30 p. 4026-4032, Oct. 2001.
- 31
32 KIKUCHI, T.; FURUTA, T.; KOJIMA, S. Membrane localization and demonstration of
33 isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**,
34 v. 122, p. 15-23, Jan. 2001.
- 35
36 LAMBERT, H. *et al.* Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii*
37 infection potentiates parasite dissemination. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 10, p.
38 1611-23, Oct. 2006.
- 39
40 LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion
41 and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 292-
42 300, Mar. 2010.
- 43
44 LANG, C.; GROß, U.; LÜDER, C. G. Subversion of innate and adaptive immune
45 responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, v. 100, n. 2, p. 191-203, 2007.
- 46
47 LANGSTON H, P. *et al.* Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-
48 specific Tcells requires extracellular ATP. **J. Immunol.**, v. 170, n. 6, p. 2962-2970, Mar.
49 2003.
- 50
51 LE MOINE, O. *et al.* Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. **J.**
52 **Immunol.**, v. 156, n. 11, p. 4408–4414, June 1996.
- 53
54 LEMGRUBER, L. *et al.* New details on the fine structure of the rhoptry of *Toxoplasma*
55 *gondii*. **Microscopy Res. Tech.**, v. 74, n. 9, p. 812-8, Sept. 2011.

- 1 LIMA, M. H. F. *et al.* *Leishmania infantum* parasites subvert the host inflammatory
2 response through the adenosine A_{2A} receptor to promote the establishment of
3 infection. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1–12, July 2017.
- 4
- 5 LINDEN, J. Purinergic Chemotaxis. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1689-1690, Dec.
6 2006.
- 7
- 8 LÜDER, C. G. *et al.* Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after
9 infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine
10 macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 8, p. 833-844, July 2003.
- 11
- 12 LYKINS, J. *et al.* Understanding toxoplasmosis in the United States through “large
13 data” analyses. **Clin. Infect. Dis.**, v. 63, n. 4, p. 468-475, Aug. 2016.
- 14
- 15 MACHALA, L. *et al.* Toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Epidemiologie,**
16 **Mikrobiologie, Immunologie**, v. 64, n. 2, p. 59-65, June 2015.
- 17
- 18 MAHAMED, D. A.; TOUSSAINT, L. E.; BYNOE, M. S. CD73-Generated Adenosine Is
19 Critical for Immune Regulation during *Toxoplasma Gondii* Infection. **Infection and**
20 **Immunity**, v. 83, n. 2, p. 721–729, Feb. 2015. Disponível em:
21 <<http://iai.asm.org/content/83/2/721.full>>. Acesso em: 19 Jan. 2018.
- 22
- 23 MARQUES-DA-SILVA, E. A. *et al.* Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*:
24 influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v.
25 10, n. 8, p. 850-857, July 2008.
- 26
- 27 MARTINA, M. N. *et al.* *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant
28 recipients. Two case reports and literature review. **Transpl. Int.**, v. 24, n. 1, p. 6-12,
29 Jan. 2011.
- 30
- 31 MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation:
32 time for reassessment. **F1000 Prime Reports**, v. 6, p. 13, Mar. 2014.
- 33
- 34 MASSAGUÉ J. TGF β signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**,
35 v. 13, n. 10, p. 616–630, Oct. 2012.
- 36
- 37 MCCALLION, K.; HARKIN, D. W.; GARDINER, K. R. Role of adenosine in
38 immunomodulation: Review of the literature. **Crit. Care Med.**, v. 32, p. 273–277, Jan.
39 2004.
- 40
- 41 MEYER-FERNANDES, J. R. *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the
42 infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 93, n. 1, p. 41-50, May 2004.
- 43
- 44 MEYER-FERNANDES, J. R. *et al.* Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania*
45 *tropica*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 341, n. 1, p. 40-46, May 1997.
- 46
- 47 MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts
48 and oocysts in felines, other mammals, and in birds. **J. Parasitol.**, v. 58, n. 5, p. 928-
49 937, Oct., 1972.
- 50
- 51 MILLS, C. D. *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v.
52 164, n. 12, p. 6166–73, June 2000.
- 53

- 1 MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells
2 requires activation of the TGF beta signaling pathway. **Cell**, v. 82, p. 287-296, July
3 1995.
4
- 5 MOFFATT, B. A.; ASHIHARA, H. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and
6 Metabolism. **The Arabidopsis Book: American Society of Plant Biologists**,
7 e0018, Apr. 2002. Disponível em: <
8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243375/>>. Acesso em: 9 Jan. 2018.
9
- 10 MORANDINI, A. C.; SAVIO, L. E.; COUTINHO-SILVA, R. The role of P2X7 receptor in
11 infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. **Biomed. J.**,
12 v. 37, n. 4, p. 169–177, Jul-Aug. 2014.
13
- 14 MORISAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs
15 by active penetration of the host cell. **J. Cell. Sci.**, v. 108, p. 2457-64, June 1995.
16 MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage
17 activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, Dec. 2008.
18
- 19 MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G.
20 **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.
21
- 22 MUNKONDA, M. N. *et al.* Inhibition of human and mouse plasma membrane bound
23 NTPDases by P2 receptor Antagonists. **Biochemical Pharmacology. Rev.**, v. 74, n.
24 10, p. 1524 –1534, Nov. 2007.
25
- 26 NAKAO, A. *et al.* TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and
27 Smad4. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 17, p. 5353-5362, Sept. 1997.
28
- 29 NATHAN, C. F. *et al.* Identification of interferon-gamma as the lymphokine that
30 activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp.**
31 **Med.**, v. 158, p. 670–89, Sept. 1983.
32
- 33 NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB**
34 **Journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, Sept. 1992.
35
- 36 NICOLLE, C. J. H; MANCEAUX, L. H. Sur une infection à corps de Leishman (ou
37 organismes voisins) du gondi. **C. R. Acad. Sci.**, Paris, v. 147, p. 763-6, 1908.
38
- 39 OLIAS, P. *et al.* Toxoplasma Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress
40 STAT1 Transcription and Block IFN- γ -Dependent Gene Expression. **Cell host &**
41 **microbe**. v. 20, n. 1, p.72-82, Jul. 2016.
42
- 43 OLIAS, P.; SIBLEY, L. D. Functional Analysis of the Role of *Toxoplasma Gondii*
44 Nucleoside Triphosphate Hydrolases I and II in Acute Mouse Virulence and Immune
45 Suppression. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 7, p. 1994–2001, June 2016.
46 Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/84/7/1994.full>>. Acesso em: 19 Jan. 2018.
47
- 48 PADRÃO, J. DA C. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1
49 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome
50 pathway. **Parasitol. Int.**, v. 63, n. 5, p. 659-63, Oct. 2014.
51
- 52 PINHEIRO, C. M. *et al.* *Leishmania amazonensis*: biological and biochemical
53 characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Exp.**
54 **Parasitol.**, v. 114, n. 1, p. 16-25, Sept. 2006.
55

- 1 PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int. Rev. Cytol.**, v. 158, p.141-
2 214, 1995.
- 3
- 4 RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines.
5 **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, Sept. 1998.
- 6
- 7 ROY, B. *et al.* Recent Trends in Nucleotide Synthesis. **Chem. Rev.**, v. 116, n. 14, p.
8 7854–7897, June 2016.
- 9
- 10 SA, Q. *et al.* Cutting edge: IFN- γ Produced by brain-resident cells is crucial to control
11 cerebral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 195, n. 3, p. 796-800, Aug.
12 2015.
- 13
- 14 SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scand. J. Infect.**
15 **Dis.**, v. 44, p. 805-14, Apr. 2012.
- 16
- 17 SAKAKI, H. *et al.* Autocrine Regulation of Macrophage Activation via Exocytosis of
18 ATP and Activation of P2Y11 Receptor. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e59778, Apr. 2013.
- 19
- 20 SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible Effects of Microbial
21 Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen
22 Interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 765–
23 781, Dec. 2008.
- 24
- 25 SCHMID-ANTOMARCHI, H. *et al.* Extracellular ATP and UTP control the generation of
26 reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a
27 charybdotoxin-sensitive Ca⁺²-dependent K⁺¹ channel. **J Immunol.**, v. 159, p. 6209-
28 6215, 1997.
- 29
- 30 SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes
31 phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage
32 evasion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 324, n. 2, p. 744-752, nov. 2004.
- 33
- 34 SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits
35 nitric oxide production of activated murine macrophages. **Exp. Parasitol.**, v. 100, p. 62-
36 70, Jan. 2002.
- 37
- 38 SIBLEY, L. D. *et al.* *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate
39 hydrolase into the parasitophorous vacuole. **Exp. Parasitol.**, v. 79, n. 3, p. 301-311,
40 Nov. 1994.
- 41
- 42 SIBLEY, L. D.; WEIDNER, E.; KRAHENBUHL, J. L. Phagosome acidification blocked
43 by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 315 n. 6018, p. 416-9, June 1985.
- 44
- 45 SILVERMAN, J. A. *et al.* Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside
46 triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of
47 intracellular parasites from infected cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 20, p. 12352-
48 12359, May 1998.
- 49
- 50 SOLLE, M. *et al.* Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. **J. Biol.**
51 **Chem.**, v. 276, p. 125–132, Jan. 2001.
- 52
- 53 SOUZA, F. S. **Avaliação da entrada e desenvolvimento de subpopulação**
54 **fosfatidilserina positiva de *Toxoplasma gondii* após tratamento com putrescina.**
55 **(Dissertação)** (Figura 2 - Representação de macrófagos infectados com distintas

- 1 subpopulações de *Toxoplasma gondii*.) Pós-graduação de Biociências e Biotecnologia
2 com ênfase em Biologia Celular Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade
3 Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014, il.
4
- 5 SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli. incontrato nelle lesioni
6 anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota
7 preliminare pel. **Rev. Soc. Scient.**, São Paulo, v. 3, p. 109-12, 1908.
8
- 9 STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse
10 macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli*
11 lipolysaccharide. **Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, Nov. 1985.
12
- 13 SURPRENANT, A.; NORTH, R. A. Signaling at purinergic P2X receptors. **Annual**
14 **Review of Physiology**, v. 71, p. 333–359, Mar. 2009.
15
- 16 SUZUKI, Y. *et al.* Interferon-gamma: the major mediator of resistance against
17 *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516-8, Apr. 1988.
18
- 19 TSUNAWAKI, S. *et al.* Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β .
20 **Nature**, v. 334, p. 260-262, July 1988.
21
- 22 UTTAH, E.; OGBAN, E.; OKONOFUA, C. Toxoplasmosis: A global infection, so
23 widespread, so neglected. **Int. J. Sci. Res. Publ.**, v. 3, n. 6, p. 1-6, June 2013.
24
- 25 VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J.**
26 **Exp. Med.**, v. 128, n. 3, p. 415-435, Sept. 1968.
27
- 28 VANCE, J. E.; STEENBERGEN, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine.
29 **Prog. Lipid. Res.**, v. 44, n. 4, p. 207-234, July 2005.
30
- 31 VASCONCELOS, E. G. *et al.* Characterization and localization of an ATP-
32 diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*.
33 **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 58, n. 2, p. 205-14, Apr. 1993.
34
- 35 WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. **J. Biol. Chem.**, v.
36 271, n. 17, p. 9898–9901, Apr. 1996.
37
- 38 WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human
39 uridine diphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 11392-11399,
40 May 1998.
41
- 42 WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal
43 oral infection and potential human hazard. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 87, n. 1, p.
44 211-6, Oct. 1954.
45
- 46 WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int. J.**
47 **Parasitol.**, v. 39, n. 8, p. 895-901, July 2009.
48
- 49 WEN, A. Y.; SAKAMOTO, K. M.; MILLER, L. S. The Role of the Transcription Factor
50 CREB in Immune Function. **J. Immunol.**, v. 185, n. 11, p.6413-6419, Dec. 2010.
51
- 52 WICKS, S. J. *et al.* Inactivation of Smad-Transforming Growth Factor B Signaling by
53 Ca²⁺-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20,
54 n. 21, p. 8103–8111, Nov. 2000.
55

- 1 WILKING, H. *et al.* Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma*
2 *gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. **Sci.**
3 **Rep.**, v. 6, n. 22551, Mar. 2016.
- 4
5 WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an
6 encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**, Washington, v. 89,
7 n. 2306, p. 226-227, Mar. 1939.
- 8
9 YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and
10 nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Crit. Rev.**
11 **Biochem. Mol. Biol.**, v. 49, n. 6, p. 473-97, Nov-Dec. 2014.
- 12
13 ZHOU, P. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in humans in China. **Parasites & Vectors**,
14 v. 4, p. 165, Aug. 2011.
- 15
16 ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on
17 nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, Jan. 2001.