

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia

Laboratório de Biologia do Reconhecer

THAÍS RIGUETI BRASIL BORGES

Envolvimento de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 na migração de macrófagos infectados por *Toxoplasma gondii*

Campos dos Goytacazes

Agosto de 2017

Envolvimento de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 na migração de macrófagos infectados por *Toxoplasma gondii*

THAÍS RIGUETI BRASIL BORGES

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.

Orientadora: Dr.^a Andrea Cristina Vetö Arnholdt
Coorientadora: Dr.^a Elena Lassounskaia

Campos dos Goytacazes

Agosto de 2017

Envolvimento de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 na migração de macrófagos infectados por *Toxoplasma gondii*

THAÍS RIGUETI BRASIL BORGES

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.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Alba Lucinia Peixoto Rangel - LBR / UENF

Prof^a. Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes – LQFPP / UENF

Prof^a. Dr^a. Luciana Belarmino da Silva – IFF / Campus Campos-Centro

Prof^a. Dr^a. Andrea Cristina Vetö Arnholdt - LBR / UENF
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia - LBR / UENF
Coorientadora

Ao meu esposo, Franz, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho e ao meu filho, Gabriel, por sempre me dar motivos para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Andrea Arnholdt pela orientação deste trabalho, pelo incentivo e por seu exemplo enquanto profissional;

Aos integrantes do nosso grupo, Amanda Vasconcellos, Bárbara Rangel, Débora Merida e Gabriel Rabello que foram decisivos para a finalização da parte experimental desta Tese; Além disso, agradeço grandemente por toda amizade, dedicação e carinho a mim dispensados;

A professora Elena Lassounskaia e sua equipe, Fabrício, Sanderson, Giliane, Andreza, Vinícius e Igor por todo apoio e contribuição;

Ao professor Renato DaMatta e sua equipe, Júlia, Gabriel, Fernanda, Nathalia, Thiago, Joaquim e Juliana pela parceria, ensinamentos e receptividade;

Ao professor João Almeida pela revisão deste trabalho;

Aos técnicos de Laboratório do LBR, Fernando, Núbia, Verônica, Rita e Juliana e aos técnicos do biotério, Maurício e Fábio, sem os quais esse trabalho certamente não seria possível;

A minha família, meu marido Franz, por ser meu conselheiro e equilíbrio nos momentos mais difíceis, agradeço grandemente por todo amor e compreensão; Ao meu filho Gabriel, por ser meu motivo para seguir em frente e ser meu presente no decorrer deste doutoramento;

A todos os meus familiares que me ajudaram muito nesta longa caminhada, meus irmãos Laísa e Lucas, meus avós Ilda e Beny (*in memoriam*), Francisca e Romeu, minha prima Mariana e em especial meus pais, Claudio e Claudia, que sempre incentivaram e apoiaram meus sonhos;

A minha segunda família, Renato, Renata, Marcell, Laura, Isadora e em especial, Carol, por toda ajuda;

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, para minha formação acadêmica, ou por deixar a vida mais leve e feliz.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”
(Marie Curie)

RESUMO

O parasita *Toxoplasma gondii* infecta leucócitos do hospedeiro e os utiliza como “Cavalos de Tróia” para se disseminar e ultrapassar barreiras biológicas, acessando assim, sítios imunoprivilegiados. Ao infectar macrófagos, o parasita promove aumento da expressão de metaloproteinases, como MT1-MMP e ADAM-10, sugerindo uma participação ativa destas moléculas nos mecanismos de invasão/migração destas células. A glicoproteína CD147 pode estar envolvida na migração de macrófagos infectados por induzir a expressão de metaloproteinases. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento de MT1-MMP, ADAM-10, CD147 e vias de γ -secretase e de furina convertase na migração de macrófagos murinos infectados por *T. gondii*. Foi avaliado por microscopia de fluorescência o perfil de expressão de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 nas primeiras 24 horas de infecção e as possíveis vias de processamento destas moléculas, utilizando inibidores de γ -secretase e de furina convertase. Macrófagos infectados por *T. gondii*, linhagem RH, foram transfectados com RNAs de interferência (siRNA) a fim de promover o silenciamento pós transcricional de MT1-MMP ou CD147. Após 24 horas de infecção, a eficiência dos siRNAs como silenciadores foi avaliada por epifluorescência e citometria de fluxo. A invasividade dos macrófagos infectados após silenciamento ou na presença dos inibidores foi analisada através do ensaio *transwell* com presença de matriz extracelular tridimensional (MATRIGEL™). Os resultados demonstraram que *T. gondii* aumenta a expressão de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 nos macrófagos durante as primeiras 24 horas de infecção e promovem um perfil de expressão similar ao de linhagens metastáticas. Além disso, a expressão de MT1-MMP é dependente de furina convertase e de ADAM-10 é mediada pelo complexo γ -secretase. Através do silenciamento gênico, foi demonstrado que CD147 regula a expressão de MT1-MMP e é essencial para a migração dos macrófagos infectados em matriz extracelular tridimensional. As proteínas γ -secretase e furina convertase também são necessárias para a migração das células infectadas em matriz extracelular 3D. Em conjunto, este trabalho apresenta novas moléculas e vias de sinalização envolvidas na disseminação de *T. gondii* ao utilizar macrófagos do hospedeiro, contribuindo, desta forma, com informações para a melhor compreensão da relação parasita-hospedeiro.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, migração, metaloproteinases.

ABSTRACT

The parasite *Toxoplasma gondii* infects host leukocytes and uses them as "Trojan horses" to spread and overcome biological barriers, thus accessing immunoprivileged sites. By infecting macrophages, the parasite promotes increased expression of metalloproteinases, such as MT1-MMP and ADAM-10, suggesting an active participation of these molecules in the mechanisms of invasion / migration of these cells. CD147 glycoprotein may be involved in the migration of infected macrophages by inducing the expression of metalloproteinases. Therefore, the objective of this work was to investigate the involvement of MT1-MMP, ADAM-10, CD147 and γ -secretase and furin convertase pathways in the migration of murine macrophages infected with *T. gondii*. The expression profile of MT1-MMP, ADAM-10 and CD147 was evaluated by fluorescence microscopy in the first 24 hours of infection and the possible processing routes of these molecules using γ -secretase and furin convertase inhibitors. *T. gondii*-infected macrophages, RH lineage, were transfected with interfering RNAs (siRNA) to promote post-transcriptional silencing of MT1-MMP or CD147. After 24 hours of infection, the efficiency of the siRNAs as silencers was evaluated by epifluorescence and flow cytometry. The invasiveness of the infected macrophages after silencing or in the presence of the inhibitors was analyzed by the transwell assay with presence of three-dimensional extracellular matrix (MATRIGEL™). The results demonstrate that *T. gondii* enhances MT1-MMP, ADAM-10 and CD147 expression in macrophages during the first 24 hours of infection and promotes an expression profile similar to that of metastatic lines. In addition, the expression of MT1-MMP is furin convertase dependent and ADAM-10 is mediated by the γ -secretase complex. Through gene silencing, it has been demonstrated that CD147 regulates the expression of MT1-MMP and is essential for the migration of infected macrophages into three-dimensional extracellular matrix. γ -secretase and furin convertase proteins are also required for the migration of infected cells into extracellular matrix 3D. Together, this work presents new signaling molecules and pathways involved in the dissemination of *T. gondii* when using host macrophages, thus contributing with information to better understand the parasite-host relationship.

Key words: *Toxoplasma gondii*, migration, metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. O ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> | 17 |
| Figura 2. Possíveis mecanismos para a travessia do <i>Toxoplasma gondii</i> pela barreira epitelial intestinal em infecções orais naturais. | 20 |
| Figura 3. Diferença entre a estrutura dos domínios dos membros da família ADAM. | 30 |
| Figura 4. Papel das MMPs no câncer..... | 34 |
| Figura 5. Metaloproteinases de Matriz de mamíferos..... | 35 |
| Figura 6. Estrutura de CD147..... | 40 |
| Figura 7. Imagem representativa da análise realizada no ImageJ para quantificar fluorescência. | 54 |
| Figura 8. Expressão de MT1-MMP em macrófagos após 1 h, 6h, 12 h e 24 h de infecção por <i>T. gondii</i> (Tg)..... | 60 |
| Figura 9. Aumento da expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 h de infecção por <i>T. gondii</i> (Tg). | 61 |
| Figura 10. Citometria de fluxo para análise da expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por <i>T. gondii</i> | 62 |
| Figura 11. Expressão de ADAM-10 em macrófagos após 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de infecção por <i>T. gondii</i> (Tg)..... | 63 |
| Figura 12. Aumento da expressão de ADAM-10 em macrófagos após 24 h de infecção por <i>T. gondii</i> (Tg)..... | 64 |
| Figura 13. Expressão de CD147 em macrófagos após 1 h, 6h, 12 h e 24 h de infecção por <i>T. gondii</i> (Tg)..... | 65 |
| Figura 14. Aumento da expressão de CD147 em macrófagos após 24 h de infecção por <i>T. gondii</i> (Tg)..... | 66 |
| Figura 15. Efeito do inibidor de furina convertase na viabilidade de macrófagos Raw 274.7 não infectados e infectados por <i>T. gondii</i> | 68 |
| Figura 16. Efeito do inibidor de γ -secretase na viabilidade de macrófagos Raw 274.7 não infectados e infectados por <i>T. gondii</i> | 68 |
| Figura 17. Expressão de MT1-MMP em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de furina convertase (2 μ M). | 70 |
| Figura 18. Expressão de ADAM-10 em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de furina convertase, (2 μ M). | 71 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19. Expressão de CD147 em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de furina convertase, (2 μ M). | 72 |
| Figura 20. Expressão de ADAM-10 em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de γ -secretase (DAPT – 20 μ M). | 74 |
| Figura 21. Expressão de MT1-MMP em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de γ -secretase (DAPT – 20 μ M). | 75 |
| Figura 22. Expressão de CD147 em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de γ -secretase (DAPT – 20 μ M). | 76 |
| Figura 23. Efeito dos inibidores de furina e γ -secretase (DAPT) sobre a invasão de macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> , utilizando matriz 3D (Transwell assay). .. | 78 |
| Figura 24. Macrófagos Raw 264.7 transfectados com diferentes concentrações de siRNA-A e reagente lipídico. | 81 |
| Figura 25. Padronização da transfecção de siRNA em macrófagos. (FITC). .. | 81 |
| Figura 26. Padronização da transfecção de siRNA em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> | 82 |
| Figura 27. Efeito da transfecção de siRNA na viabilidade de macrófagos não infectados e infectados por <i>T. gondii</i> | 83 |
| Figura 28. Expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por <i>T. gondii</i> e 18 h de transfecção com siRNA MT1-MMP. | 85 |
| Figura 29. Citometria de fluxo para análise da expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por <i>T. gondii</i> e 18 h de transfecção. .. | 86 |
| Figura 30. Expressão de CD147 em macrófagos após 24 horas de infecção por <i>T. gondii</i> e 18 h de transfecção com siRNA CD147. | 87 |
| Figura 31. Expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por <i>T. gondii</i> e 18 h de transfecção com siRNA CD147. | 89 |
| Figura 32. Invasão e migração de macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> após transfecção com siRNA específico para CD147. | 91 |
| Figura 33. Invasão e migração de macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> após transfecção com siRNA específico para MT1-MMP. | 92 |
| Figura 34. Envolvimento das MMPs no fenótipo hipermigratório de macrófagos murinos infectados por <i>T. gondii</i> | 101 |

LISTA DE TABLELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Múltiplas Funções de ADAM-10, MT1-MMP e CD147 em processos fisiológicos e patológicos..... | 44 |
|--|----|

LISTA DE SIGLAS

- ADAM** – *A Disintegrin And Metalloprotease* - Uma Desintegrina e Metaloprotease
- ADAM-10** – *A Disintegrin And Metalloprotease Domain 10* - Uma Desintegrina e Metaloprotease com domínio 10
- AIDS** – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Humana
- APC** – *Antigen Presenting Cell* - Célula Apresentadora de Antígeno
- APP** – *Amyloid Precursor Protein* - Proteína Precursora Amilóide
- BSA** – *Bovine Serum Albumin* - Albumina Sérica Bovina
- CD147** – *Cluster of Differentiation 147* – grupo de diferenciação 147
- CD44** – *Cluster of Differentiation 44* – grupo de diferenciação 44
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DAPI** – *4',6-Diamidino-2-Phenylindole* - 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
- DAPT** - *N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester*
- DC** – *Dendritic Cell* - Célula Dendrítica
- EGF** – *Epidermal Growth Factor* - Fator de Crescimento Epidermal
- FcR** – *Fc receptor* - receptor Fc
- GPI** – *Glycosylphosphatidylinositol* - Glicosilfosfatidilinositol
- GRA** - *dense Granule Antigen* – antígenos de grânulos densos
- HIV** - *Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana
- ICAM** – *Intercellular Adhesion Molecule* - Molécula de Adesão Intercelular
- IFN** – Interferon
- Ig** – Imunoglobulina
- IL** – Interleucina
- MEC** – Matriz extracelular
- MHC** – *Major Histocompatibility Complex* - Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MMP** – *Matrix Metalloproteinase* - Metaloproteinase de Matriz
- MT1-MMP** – *Membrane type 1-matrix metalloproteinase 1* - Metaloprotease de Matriz tipo 1 de Membrana

MT-MMP – *Membrane Type Matrix Metalloproteinase* - Metaloprotease de Matriz associada a Membrana

MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NF- κ B – *Factor Nuclear kappa B* - Fator Nuclear kappa B

NK – *Natural Killer*

NO – *Nitric oxide* - Óxido Nítrico

PBS – *Phosphate Buffer Solution* - Salina Fosfatada Tamponada

PV - *Parasitophorous Vacuole* – Vacúolo Parasitóforo

ROPs - *Rhoptry proteins* – Proteínas de roptrias

RPMI – Roswell Park Memorial Institute – Meio sintético complexo

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

TGF – *Transforming Growth Factor* - Fator Transformador de Crescimento

T_H – *T helper lymphocytes* - Linfócitos T auxiliares

TIMPs- *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* - Inibidores Teciduais de Metaloproteinases;

TLR – *Toll-Like receptors* - Receptores Toll-like

TNF – *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral

uPA - *Urokinase-type plasminogen activator* - Ativador de Plasminogênio tipo uroquinase

uPAR- *Urokinase Plasminogen Activator Receptor* - Receptor de Ativador de Plasminogênio tipo uroquinase

VCAM- Molécula de Adesão Vascular;

Zn – Zinco

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 16 |
| 1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e seu ciclo biológico | 16 |
| 1.2 Infecção e disseminação de <i>T. gondii</i> no hospedeiro | 19 |
| 1.3 Resposta imunológica e mecanismos de modulação imune..... | 22 |
| 1.3 Utilizando leucócitos como “Cavalos de Tróia”. | 25 |
| 1.4 Metaloproteinases..... | 28 |
| 1.4.1 ADAMs | 29 |
| 1.4.2 Metaloproteinases de matriz..... | 33 |
| 1.4.3 CD147..... | 39 |
| 2. Justificativa | 43 |
| 3. Objetivos..... | 45 |
| 3.1 Objetivo Geral | 45 |
| 3.2 Objetivos específicos | 45 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 46 |
| 4.1 Animais | 46 |
| 4.2 Anticorpos utilizados | 46 |
| 4.3 Obtenção de <i>T. gondii</i> para infecção <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.4 Infecção <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.5 Inibidores de Furina e γ -secretase | 48 |
| 4.6 Silenciamento gênico utilizando siRNA em macrófagos murinos infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> | 49 |
| 4.6.1 Reagentes para silenciamento gênico utilizando siRNAs | 49 |
| 4.6.2 Padronização da transfecção de siRNA em Raw 264.7 | 49 |
| 4.6.3 Transfecção utilizando siRNAs específicos para MT1-MMP e CD147 | 50 |
| 4.7 Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT após tratamento com siRNA-A e com inibidores de furina e γ -secretase. | 51 |
| 4.8 Análise da expressão de MT1-MMP, CD147 e ADAM-10 por microscopia de fluorescência..... | 52 |
| 4.8.1 Mensuração da fluorescência de MT1-MMP, CD147 e ADAM-10..... | 53 |
| 4.9 Análise da expressão de MT1-MMP por Citometria de Fluxo | 55 |
| 4.10 Análise da capacidade de adesão e transmigração de macrófagos <i>in vitro</i> (<i>Transwell assay</i>)..... | 55 |
| 4.11 Análise estatística | 57 |
| 5. Resultados..... | 58 |

| | |
|---|-----|
| 5.1 <i>T. gondii</i> aumenta a expressão de MT1-MMP, CD147 e ADAM10 em macrófagos. | 58 |
| 5.2 Efeito dos inibidores de furina convertase e γ -secretase nos macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> | 67 |
| 5.2.1 Efeito dos inibidores de furina convertase e γ -Secretase no processamento de MT1-MMP, ADAM-10 e na expressão de CD147. | 69 |
| 5.2.1.1 Furina convertase pode participar do processamento de MT1-MMP em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> | 69 |
| 5.2.1.2. γ -Secretase pode participar do processamento de ADAM-10 em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> | 73 |
| 5.2.2 Furina convertase e γ -Secretase são necessárias para promover a invasão/migração de macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> em matriz extracelular tridimensional..... | 77 |
| 5.3 Silenciamento gênico de MT1-MMP e CD147 por siRNA em macrófagos murinos infectados por <i>T gondii</i> | 79 |
| 5.3.1 Padronização <i>in vitro</i> da transfecção de siRNA em macrófagos infectados por <i>T gondii</i> | 79 |
| 5.3.2 siRNAs específicos reduzem a expressão de MT1-MMP e CD147 em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> | 83 |
| 5.3.3 CD147 pode estar envolvida na ativação de MT1-MMP em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> | 88 |
| 5.3.4 A utilização de siRNA específico para CD147 reduz a invasão/migração de macrófagos infectados por <i>T. gondii</i> em matriz extracelular tridimensional..... | 90 |
| 6. Discussão | 93 |
| 7. Conclusões | 103 |
| 8. Referências..... | 104 |

1. Introdução

1.1 *Toxoplasma gondii* e seu ciclo biológico

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, capaz de infectar células nucleadas de animais endotérmicos. Os felídeos são seus hospedeiros definitivos e mais de 30 espécies de aves e 300 espécies de mamíferos não felídeos, seus hospedeiros intermediários (DUBEY e BEATTIE, 1988). Nicolle e Manceaux (1908) identificaram o parasita pela primeira vez no sangue e tecidos de um roedor Norte Africano, *Ctenodactylus gundi*, e o nomearam de *Toxoplasma* (do grego *toxos* = arco e *plasma* = corpo) *gondii* (devido ao *C. gundi*). No mesmo ano, Splendore identificou o novo protozoário em coelhos no Brasil.

O parasita apresenta um ciclo de vida com fase sexual e assexual e possui três estágios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos (cistos) e esporozoítos (ocistos), o que contribui para o sucesso na expansão em muitos hospedeiros (WEISS e DUBEY, 2009). Os taquizoítos são a forma que causa infecção aguda em humanos e nos outros hospedeiros intermediários. Estes infectam células nucleadas, se replicando em um grande número de descendentes e promovendo a saída por lise da célula hospedeira. Sob resposta do sistema imunitário do hospedeiro, o parasita irá diferenciar-se em bradizoítos, uma forma de crescimento lento contida em cistos e encontrada em alguns tipos de tecidos, tais como em tecidos musculares e neuronais (ODAERT et al., 1996). A ingestão de animais com bradizoítos no tecido libera parasitas no trato intestinal, e em felídeos isso resulta no desenvolvimento sexual e posterior liberação de ocistos no ambiente. Em outros hospedeiros, pode conduzir a uma infecção disseminada. Ocistos se desenvolvem em esporozoítos haplóides no ambiente. A ingestão oral desses esporozoítos leva à diferenciação em taquizoítos no íleo e infecção aguda nos hospedeiros intermediários (SPEER et al., 1999) (Figura 1).

Vários fatores contribuem para a disseminação do *T. gondii* no organismo de seus hospedeiros, incluindo a transmissão feita por meios verticais e horizontais

(KIM & WEISS, 2004). A infecção em humanos pode ser adquirida pela ingestão oral de esporozoítos provenientes do ambiente (água, solo, vegetais e frutas), por ingestão oral de cistos teciduais, ou por transmissão transplacentária de taquizoítos (Figura 1). O *T. gondii* também pode ser transmitido por transfusão de sangue, transplante de órgãos ou pelo consumo de leite não pasteurizado (HILL e DUBEY, 2002; GANGNEUX e DARDE, 2012).

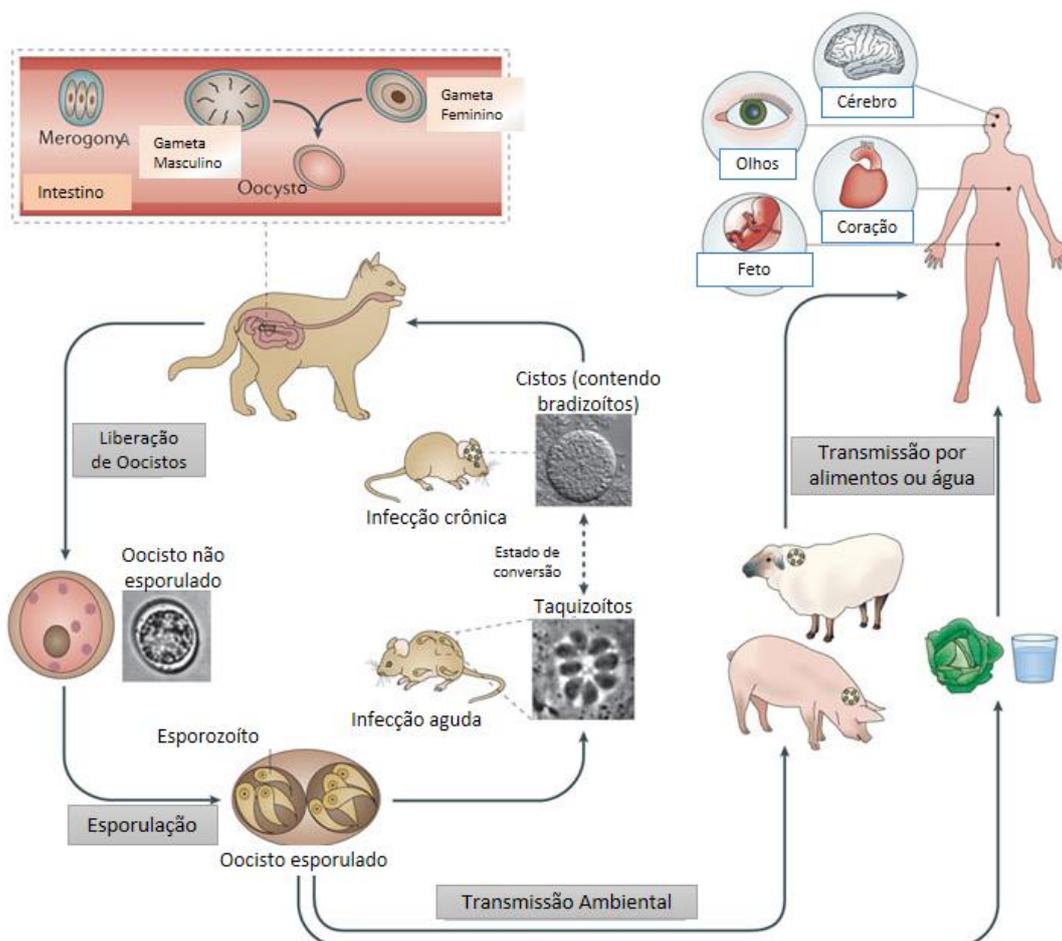


Figura 1. O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Traduzido de Hunter & Sibley, 2012

Estima-se que a infecção esteja presente em aproximadamente um terço da população humana. No entanto a prevalência do *T. gondii* varia muito de país para país. Esta variação baseia-se nos diferentes hábitos alimentares, condições sanitárias, bem como nos fatores ambientais que influenciam na estabilidade dos oocistos no solo e na água (PAPPAS et al., 2009; GANGNEUX e DARDE, 2012).

O Brasil apresenta altas taxas de infecção, sendo que 50% das crianças e 50-80% das mulheres em idade fértil possuem anticorpos contra este parasita (DUBEY *et al.*, 2012).

A estrutura populacional global de *T. gondii* é complexa e varia por região geográfica (SU *et al.*, 2012). As linhagens que são encontradas na América do Sul são mais divergentes, já na América do Norte e na Europa, a estrutura da população é notavelmente clonal e nestas regiões os isolados de *T. gondii* compreendem quatro linhagens principais: os tipos I, II, III e o haplótipo 12 (SIBLEY e AJJOKA, 2008; KHAN e DUBEY, 2011). A linhagem tipo I é a mais virulenta em camundongos, e apresenta um fenótipo altamente migratório, o que pode contribuir para sua disseminação nos hospedeiros infectados (SAEIJ *et al.*, 2005). A linhagem tipo II é comumente associada à doença humana (BOOTHROYD e GRIGG, 2002) e as tipo III e 12 são frequentemente encontradas em gado e animais selvagens, respectivamente (KHAN *et al.*, 2011).

A maior parte da população humana mundial infectada por *T. gondii* é assintomática, pois o sistema imunológico geralmente mantém o parasita em estágio crônico sem causar a doença (PAPPAS *et al.*, 2009). No entanto, cerca de 10% dos pacientes desenvolvem linfadenite ou uma síndrome gripal leve ou ainda uma doença semelhante à mononucleose. Além disso, indivíduos imunocompetentes podem desenvolver a toxoplasmose ocular (coriorretinite) como uma manifestação da infecção primária ou crônica (HAVELLAR *et al.*, 2007).

A infecção tem recebido atenção médica e científica considerável em indivíduos imunocomprometidos, visto que na maioria dos casos resulta em reativação do toxoplasma latente preexistente. Esta reativação pode ser fatal, uma vez que na maioria das vezes envolve danos no sistema nervoso central (SNC) e os sintomas podem incluir meningoencefalite ou lesão de massa encefálica, dor de cabeça, confusão, febre, letargia, convulsões e perda de sinais neurológicos (YAROVINSKY, 2014). Em gestantes, a infecção primária com *T. gondii* pode resultar em morte intra-uterina e abortos espontâneos, ou em manifestações clínicas no feto como: hidrocefalia, microcefalia ou macrocefalia,

encefalite, calcificações, coriorretinite e cegueira. A sintomatologia clínica está muitas vezes ausente em crianças ao nascimento, mas se não tratados podem desenvolver sequelas tardias (coriorretinite, complicações neurológicas ou desordens cognitivas) (TORGERSON e MASTROIACOVO, 2013).

As manifestações clínicas da toxoplasmose são influenciadas pelo genótipo do parasita, pelo *background* genético e *status* imunológico do hospedeiro, dentre outros fatores (DENKERS, 2003; HUNTER e SIBLEY, 2012; PITTMAN e KNOLL, 2015). O *T. gondii* é capaz de atravessar barreiras biológicas como a placentária, hemato-retiniana e hemato-encefálica para se estabelecer em tecidos imunoprivilegiados e grande parte das manifestações clínicas da doença são o resultado da destruição tecidual e da resposta inflamatória induzida por parasitas disseminados nestes tecidos (PITTMAN e KNOLL, 2015). A disseminação de taquizoítos em tecidos secundários distantes é claramente um fator chave e que precisa ser melhor compreendido para o desenvolvimento de abordagens específicas para limitar a propagação deste parasita.

1.2 Infecção e disseminação de *T. gondii* no hospedeiro

Dentro de seus hospedeiros vertebrados, o *T. gondii* encontra muitos desafios na travessia de barreiras biológicas, evitando a ação do sistema imunológico e estabelecendo o seu nicho como um parasita intracelular. Após infecção oral, esporozoítos ou bradizoítos resistem à degradação no estômago e eventualmente alcançam o lúmen intestinal, onde são capazes de atravessar a barreira epitelial (BARRAGAN e SIBLEY, 2002).

Três mecanismos são propostos para a travessia do parasita pela barreira epitelial intestinal (Figura 2). No primeiro, taquizoítos livres transmigram de maneira paracelular (entre as células) com participação de receptores e manutenção da integridade da camada epitelial (BARRAGAN et al., 2005, WEIGH e CARDING, 2012) ou de maneira transcelular (através das células), com invasão ativa destes parasitas na parte apical da célula epitelial e saída pelo domínio basolateral. Como segundo mecanismo, os parasitas podem infectar

leucócitos que transmigram através do epitélio para a lâmina própria (mecanismo Cavalo de Tróia) (DA GAMA et al., 2004). Além disso, como um mecanismo alternativo, indutores de apoptose presentes na barreira epitelial podem bloquear a infiltração de leucócitos e induzir a saída do parasita nestas células, com subsequente travessia de *T. gondii* pela barreira (LAMBERT e BARRAGAN, 2010).

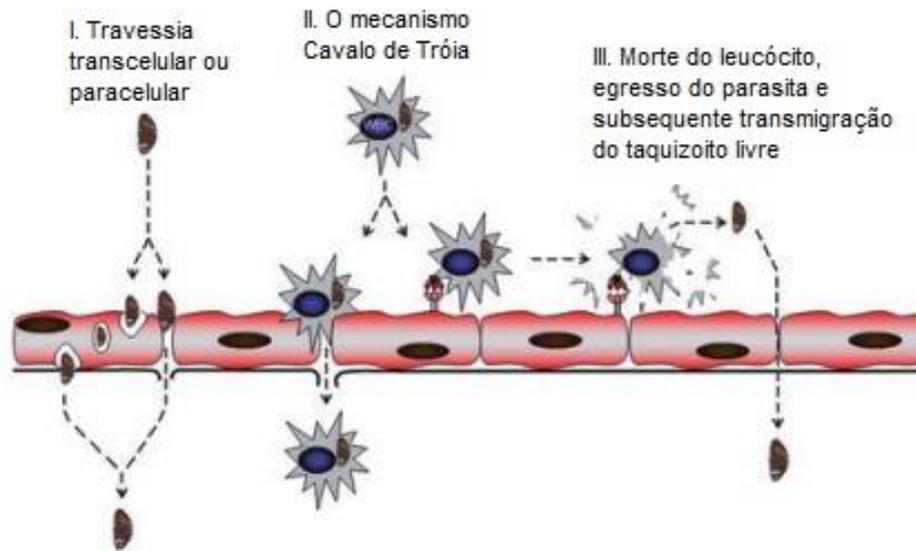


Figura 2. Possíveis mecanismos para a travessia do *Toxoplasma gondii* pela barreira epitelial intestinal em infecções orais naturais. Modificado de Lambert & Barragan, 2010.

Ao transmigrar por células epiteliais, os parasitas se convertem em taquizoítos proliferativos, que sofrem um ciclo lítico assexuado de crescimento intracelular, rompem a célula hospedeira e são liberados tanto no lúmen intestinal quanto nos tecidos subjacentes da lâmina própria, onde ativam uma resposta imune pró-inflamatória (HOFF e CARRUTHERS, 2002). A infecção se espalha rapidamente para os gânglios linfáticos de drenagem e para os demais órgãos como pulmão e cérebro (DUNAY e SIBLEY, 2010).

Como um patógeno intracelular, *T. gondii* possui uma grande diversidade de proteínas que são secretadas por organelas especializadas e que estão relacionadas com a motilidade do parasita, invasão da célula hospedeira, sobrevivência intracelular, aquisição de nutrientes durante a replicação e eventual saída da célula hospedeira. A secreção de proteínas ocorre

principalmente a partir de três organelas com estruturas distintas: micronemas, róptrias e grânulos densos (DUBEY et al., 1998).

O processo de invasão de *T. gondii* tem início quando o taquizoíto entra em contato com a superfície da célula hospedeira. No momento da adesão do taquizoíto à superfície da célula hospedeira, há secreção das proteínas dos micronemas e róptrias (ROPs) (CARRUTHERS et al., 1999; CARRUTHERS e TOMLEY, 2008; MORDUE et al., 1999; HÅKANSSON e CHARRON, 2001; SHEN e SIBLEY., 2012; BECK et al, 2014). Enquanto o parasito invade a célula, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo (PV). Esse vacúolo tem características não fusogênicas, evitando a fusão com os elementos das vias endo e exocíticas da célula hospedeira e escapando, assim, de uma fusão com os lisossomas (HUNTER e SIBLEY, 2012).

As róptrias, no momento da adesão e após a invasão, secretam seus conteúdos na célula hospedeira através de vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo (MORDUE et al., 1999; HÅKANSSON e CHARRON, 2001; SHEN e SIBLEY., 2012; BECK et al, 2014) ou serão liberadas no citosol, onde serão dirigidas para o núcleo da célula hospedeira (SAEIJ et al., 2007). Além das ROPs, as proteínas dos grânulos densos (GRA) preparam o PV para replicação e sobrevivência do parasita (CARRUTHERS e SIBLEY 1997; ROBIBARO et al. 2001; SIBLEY 2004).

A infecção por *T. gondii* induz muitas alterações na transcrição gênica da célula hospedeira, incluindo os genes envolvidos no metabolismo energético, nas respostas imunitárias e na sinalização (MOLESTINA, 2003; HAKIMI et al., 2017). Tanto o parasita como o hospedeiro desenvolveram várias estratégias para diminuir as lesões colaterais imediatamente após a infecção, interferindo desta forma na imunidade e sinalização celular, além de bloquear a apoptose, permitindo que a célula hospedeira infectada permaneça viva (BRASIL et al, 2017).

Mesmo sendo capaz de infectar qualquer célula nucleada, sabe-se que o *T. gondii* explora a motilidade das células imunológicas para se dispersar no organismo de seus hospedeiros, por meio do mecanismo “Cavalo de Tróia” (DA

GAMA et al., 2004). Este mecanismo pode permitir a entrada do parasita em sítios imunoprivilegiados, como cérebro, retina e placenta, onde nos quais permanecerá latente através de um fino ajuste da resposta imune.

1.3 Resposta imunológica e mecanismos de modulação imune.

A imunidade ao *Toxoplasma gondii* é essencialmente ligada ao sucesso da resposta imune celular. Depois da infecção oral, uma ileíte de moderada a severa é observada em modelos murinos (DUPONT et al., 2012). Monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (CDs) são recrutados para o sítio de infecção. Todos estes tipos celulares estão relacionados à capacidade do hospedeiro em eliminar taquizoítos durante a infecção aguda e controlar a persistência de bradizoítos encistados, evitando a reemergência de taquizoítos (GAZZINELLI et al., 1993).

A resposta imunológica desempenha importante função no controle do parasita. O reconhecimento de taquizoítos, feito principalmente por macrófagos, neutrófilos e CDs promovem a produção de interleucina 12 (IL-12), que estimula células *natural killers* (NK) e células T a produzirem interferon-gamma (IFN- γ) (GAZZINELLI et al., 1994; HUNTER et al., 1994). O IFN- γ é o principal mediador da resistência ao *T. gondii* e promove múltiplos mecanismos intracelulares para matar o parasita e inibir sua replicação através da indução robusta de quase 2000 genes conhecidos como genes induzíveis por IFN- γ (KIM et al., 2012). Camundongos com deficiência em IL-12 ou IFN- γ que são infectados com *T. gondii* desenvolvem a forma aguda da doença e demonstram inabilidade em controlar o parasita (SUZUKI et al., 1988).

Outras citocinas estão relacionadas ao controle da infecção como TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-4. Estas atuam num balanço delicado entre a inibição da replicação dos bradizoítos e da amplificação da resposta inflamatória exacerbada, potencialmente deletéria ao hospedeiro (CHAO et al., 1994; DENKERS e GAZZINELLI, 1998). A presença de IL-27, que é capaz de suprimir a diferenciação de células Th17, também parece ser fundamental, uma vez que

camundongos deficientes para o receptor de IL-27 têm um aumento da resposta de células Th17, levando à neuro-inflamação severa associada as células TCD4⁺ (STUMHOFER et al., 2006).

Células T CD4⁺ são críticas para a resistência durante a toxoplasmose. Pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com declínio do número destas células, apresentam a forma aguda da doença (ISRAELSKI e REMINGTON, 1988; LUFT et al., 1984). Durante os estágios iniciais da infecção, estas células também contribuem para a resposta de células B e T CD8⁺ (LÜTJEN et al., 2006). Células T CD8⁺ podem controlar a infecção através da produção de citocinas como IFN- γ , interação CD40/CD40L, e lise das células infectadas mediada por perforinas. Camundongos deficientes em células T CD8⁺ também possuem susceptibilidade aumentada a toxoplasmose (MONTROYA et al., 1996; DENKERS e Sher, 1997; REICHMANN et al., 1997).

Além da resposta imune celular, a infecção por *T. gondii* também induz produção de anticorpos contra os taquizoítos extracelulares. Os anticorpos produzidos atuam mediando a morte dos parasitas na presença do complemento na tentativa de limitar sua multiplicação, dentre outros mecanismos tais como opsonização e aumento da fagocitose pelos macrófagos (SENSINI et al., 1996). Dentro de duas semanas após a infecção, anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE anti-proteínas de *T. gondii* já podem ser encontrados no soro. (RORMAN et al., 2006).

Ao mesmo tempo em que é gerada uma resposta imune eficaz, várias estratégias são utilizadas pelo *T. gondii* para modular a resposta imunológica do hospedeiro a seu favor. A invasão ativa deste parasita forma uma junção móvel (JM) na superfície da célula hospedeira, onde se acredita formar-se um ponto de ancoragem estável para a penetração (MORDUE et al., 1999; BECK et al., 2014). A JM funciona de maneira seletiva, recrutando proteínas celulares para a formação do vacúolo parasitóforo (PV) e excluindo proteínas transmembranas do hospedeiro, como os receptores de fosfato manose (MPRs), receptores de transferrina (TfR), proteína 1 associada a lisossomas (LAMP1) (MORDUE et al., 1999) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) (MORDUE et al., 1999). O PV formado apresenta natureza não fusogênica com o sistema endocítico da

célula hospedeira. Desta maneira, o parasita evade a imunidade celular autônoma evitando a destruição lisossomal (BESTEIRO, 2012).

Proteínas do *T. gondii* podem interagir diretamente com as vias de transdução de sinal e ativadores da transcrição (STATs) da célula hospedeira, influenciando na transcrição de moléculas pró-inflamatórias (BUTCHER et al., 2005; LANG et al., 2007, AHN et al., 2009, RAUCH et al., 2013). A rópria 16 kinase do toxoplasma (ROP16), que é secretada no citosol da célula hospedeira após a invasão de taquizoítos tipo I, fosforila diretamente STAT3, STAT5 e STAT6 (SAEIJ et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2009; BUTCHER et al., 2011; JENSEN et al, 2013), sugerindo que essa molécula inibe respostas pró-inflamatórias, reduzindo por exemplo, a produção de IL-12 em macrófagos murinos e a geração de imunidade protetora no intestino de animais infectados (ONG et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2011; JENSEN et al, 2013). A rópria 18 kinase (ROP18) também está envolvida na modulação imune do hospedeiro, inibindo a via NF-kappaB (NF-KB) e suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos parasitados (DU et al., 2014).

Foi demonstrado que, durante a infecção, *T. gondii* também é capaz de inibir a produção de moléculas microbicidas, como o óxido nítrico (NO), em macrófagos inflamatórios (SEABRA et al., 2002, LÜDER et al. 2003, SHRESTHA et al., 2006). Macrófagos ativados com IFN- γ produzem NO via enzima NO sintase induzida (iNOS), porém a infecção por *T. gondii* é capaz de inibir a produção de NO pela degradação da iNOS através da via do proteossomo (DA CRUZ PADRÃO et al., 2014).

Leucócitos infectados por *Toxoplasma gondii* apresentam resistência a múltiplos indutores de apoptose (NASH et al., 1998), o que permite ao parasita sobreviver e persistir dentro do hospedeiro (SINAI et al, 2004). Dentre as estratégias para manter a célula viva, o parasita é capaz de inibir o início da cascata apoptótica desencadeada tanto pela via mitocondrial quanto pela via de receptor de morte nas células infectadas. Os mecanismos incluem o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria (GOEBEL et al., 2001, CARMEN et al., 2006, HIPPE et al., 2009), alterações do equilíbrio entre as proteínas Bcl-2 pró e anti-apoptóticas (GOEBEL et al. , 2001), inibição direta da ativação da

casca de caspase mediada por citocromo c (KELLER et al., 2006), degradação da caspase 8, bloqueio da apoptose mediada por Fas / CD95 (VUTOVA et al., 2007; HIPPE et al., 2008), inativação da caspase 3 e PARP (KIM et al., 2006) e bloqueio da atividade da granzima B (YAMADA et al., 2011).

Muitos dos mecanismos de modulação e evasão imune descritos anteriormente, são demonstrados através de estudos feitos com leucócitos infectados, visto que *T. gondii* infecta ativamente monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs), presentes na lâmina própria próxima ao sítio de entrada do parasita (WILSON e REMINGTON, 1979; CHANNON et al., 2000; SUBAUSTE e WESSENDARP, 2000). Por estarem presentes na circulação e nos tecidos periféricos, estes leucócitos são utilizados pelo *T. gondii* como “Cavalos de Tróia”, e medeiam a dispersão deste parasita no organismo de seus hospedeiros (DA GAMA et al., 2004, COURRET et al., 2006; LAMBERT et al., 2006).

1.3 Utilizando leucócitos como “Cavalos de Tróia”.

Patógenos com potencial neurotrópico e neurovirulento podem entrar no sistema nervoso central (SNC) pelo mecanismo "Cavalo de Tróia". *Listeria monocytogenes*, por exemplo, infecta preferencialmente células mononucleares de sangue Ly6C + para atingir o SNC (DREVETS et al., 2004; JOIN-LAMBERT et al., 2005). O vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium tuberculosis* também aproveitam a migração das células monocíticas para atingir este sítio imunoprivilegiado (NOTTET et al., 1996; SCHLESINGER, 1996; PERSIDSKY et al., 1997; FELDMESSER et al., 2001; CHARLIER et al., 2009)

Diferentes estudos demonstram que a infecção de DCs, monócitos e macrófagos com taquizoítos de *T. gondii* promove aumento da capacidade migratória e invasiva destas células *in vitro*, o que está diretamente relacionado com o aumento da disseminação do parasita *in vivo* (LÜDER et al., 2001; LÜDER et al., 2003; DA GAMA et al., 2004; LAMBERT et al., 2006; TARDIEUX e

MENARD, 2008). Os leucócitos infectados por este parasita são capazes de atravessar barreiras teciduais (BARRAGAN e SIBLEY, 2003), incluindo a barreira epitelial da mucosa intestinal (DUBEY, 1997, DUBEY et al., 1997b, BARRAGAN e SIBLEY, 2002), o endotélio vascular (LAMBERT et al., 2006; FURTADO et al., 2012), a barreira hemato-encefálica (COURRET et al., 2006, LACHENMAIER et al., 2011), hemato-retiniana (FURTADO et al., 2013) e a interface materno-fetal (ROBBINS et al., 2012).

A migração de leucócitos está relacionada com a manutenção da homeostasia, tráfego inflamatório, embriogênese, processos regenerativos e doenças como o câncer (SWANEY, et al., 2010). Na migração de células imunológicas, uma sequência bem orquestrada de etapas pode ser observada, como mudanças de polaridade, protrusão e retração, e adesão/desadesão a outras células ou à matriz extracelular (MEC) (LUSTER et al., 2005). Estes leucócitos são capazes de atravessar camadas teciduais como endotélio vascular e epitélio, por mediação de selectinas e seus ligantes e adesão dependente de integrinas e moléculas de adesão celular (CAMs), que promovem a posterior transmigração paracelular e transcelular (LEY et al., 2007). Vários fatores podem influenciar na eficiência da interação célula-célula, incluindo a natureza do estímulo que gera a polarização, a densidade dos receptores de adesão e a cinética de associação/dissociação entre as moléculas de adesão (KINASH, 2005).

Células apresentadoras de antígenos (APCs) são predominantemente encontradas nos tecidos e após ativação migram através dos vasos linfáticos e sangue para os linfonodos, onde atuam iniciando a resposta imune adaptativa (BANCHEREAU et al. 2000; MARTÍN-FONTECHA et al. 2003). A ativação destas células inicia uma série de alterações fenotípicas que são em conjunto chamadas de maturação (UENO et al., 2007). Durante a maturação, as APCs processam os peptídeos antigênicos para apresentação via moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) e também super-regulam moléculas co-estimulatórias, que são essenciais para a subsequente ativação de células T CD4 + e CD8 +. A maturação também promove mudanças no comportamento migratório, regulando negativamente os receptores inflamatórios de quimiocinas

e super-regulando os receptores de quimiocina CCR7 (*C-C chemokine receptor 7*) e CXCR4, o que lhes confere a capacidade de responder as quimiocinas presentes nos órgãos linfóides secundários (SALLUSTO et al., 1998; SOZZANI et al., 1998).

A infecção com *T. gondii* altera o perfil de migração de APCs para os linfonodos, visto que é observado uma retenção temporária destas células nos nódulos linfáticos de drenagem. Além disso, a persistência do parasita no hospedeiro, principalmente no SNC, parece ser favorecida, visto que APCs infectadas alcançam linfonodos distais que estão próximos dos sítios imunoprivilegiados quando são inoculadas por via intraperitoneal (i. p) em camundongos, diferente do que ocorre quando a inoculação é feita apenas com parasitas livres (DA GAMA et al., 2004; LAMBERT et al., 2006; LAMBERT et al., 2010; UNNO et al., 2008).

Células dendríticas (DCs) infectadas apresentam alterações morfológicas e moleculares que estão associadas a um fenótipo hipermigratório, diferente do observado quando estas células são estimuladas apenas com lipopolissacarídeo de membrana (LPS) ou com IFN- γ (LAMBERT et al., 2006; LEE et al., 2014). A invasão ativa de taquizoítos em DCs imaturas promove redistribuição de actina no citoesqueleto, diminui a expressão de integrinas ($\beta 1$, $\beta 2$, CD18 e CD11c) e L-selectina na membrana plasmática nas primeiras 24h de infecção. Além disso, provoca perda de uma estrutura conhecida como podossomos nestas células (LAMBERT et al., 2006; Lambert et al., 2009; WEIDNER et al., 2013).

O *Toxoplasma gondii* também é capaz de infectar monócitos/macrófagos ativamente, sendo essas as principais células imunes infectadas no sangue periférico (BERMUDEZ et al., 1993). Por apresentarem a função primária de migrar da corrente sanguínea para os tecidos (SERBINA et al., 2008), elas podem servir como um meio de transporte ideal para parasitas se espalharem do sítio de entrada para órgãos distantes. De fato, em camundongos, o parasita pode ser transportado por macrófagos CD11b⁺/CD11c⁻ para o SNC (COURRET et al., 2006; LAMBERT e BARRAGAN, 2010).

A infecção também promove mudanças na regulação transcricional de células endoteliais barreira hematoencefálica. Os genes regulados correspondem a moléculas envolvidas na interação entre células imunes e funções da barreira hemato-encefálica do hospedeiro, evidenciando o papel dos leucócitos na neuroinvasão do parasita (LACHENMAIER et al., 2011). Moléculas de adesão, incluindo E- e P-selectina e ICAM-1, interleucina-6 (IL-6), quimiocinas como CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CXCL1 (GRO-1), CXCL2 (GRO-2) e CX3CL1, moléculas de sinalização e receptor do tipo toll 4 (TLR-4) são super-reguladas nas células endoteliais da barreira hematoencefálica após infecção, promovendo a quimiotaxia de leucócitos infectados para estes sítios (KHAN ET AL., 2006; STEIN e NOMBELA-ARRIETA, 2005; BIJLI et al., 2008).

Os mecanismos de migração e transmigração também envolvem a interação de leucócitos infectados com componentes da matriz extracelular (MEC). Estudos demonstram que DCs e macrófagos infectados por *T. gondii* apresentam perfis de adesão aos componentes da MEC diferentes do observado em leucócitos estimulados com LPS ou IFN- γ . Além disso, são capazes de degradar componentes da MEC por aumentarem a expressão/secreção de metaloproteínases de matriz, adquirindo um fenótipo similar ao de células tumorais metastáticas (SEIPEL et al., 2010; SCHUINDT et al., 2012). Este fenótipo leva à desorganização e à fragmentação dos componentes do estroma e da membrana basal e podem facilitar o processo de transmigração de leucócitos infectados pelas barreiras teciduais (FLORES-BORJA et al., 2016).

1.4 Metaloproteínases

A família de metaloproteases ou metaloproteínases possui função relacionada ao metabolismo da matriz extracelular. Estas metaloproteínases são divididas em três grupos: as metaloproteínases da matriz (MMPs, matrixinas), as proteínas desintegrinas e metaloproteínases (ADAMs), e as astacinas (SALOWE et al., 1992; STÖCKER e BODE, 1995). Esses grupos compreendem uma grande variedade de endopeptidases, que possuem o íon zinco (Zn^{2+}) em seu

centro ativo (por isso o utilização do prefixo "Metalo"). Além disso, pertencem ao clã das metzincinas, que apresentam o motivo 3-histidina (His) (His-Glu-Xaa-Xaa-His + His) e uma metionina conservada (Met) no sítio ativo (STÖCKER e BODE, 1995).

As metzincinas, possuem um resíduo de glutamato (Glu) dentro do motivo catalítico que ativa uma molécula de H₂O ligada ao zinco criando o nucleófilo, que corta as ligações peptídicas. A hidrólise das ligações peptídicas é feita internamente na cadeia polipeptídica entre as extremidades N (amino) e C (carboxi)-terminal de seus substratos (BODE et al., 1996).

Com exceção das astacinas, que desempenham papéis específicos durante o desenvolvimento embrionário e formação óssea (BOND e BEYNON, 1995), tanto as ADAMs quanto as MMPs são super-reguladas em muitos tipos de células cancerígenas, e por isso, recebem muita atenção nas áreas de progressão tumoral e metástase. Além disso, estão associadas a doenças inflamatórias agudas com consequente dano tecidual (FINGLETON, 2006; HU et al., 2007). A super-expressão destas moléculas em leucócitos infectados por *T. gondii* pode favorecer os mecanismos de migração e invasão destas células, e por este motivo, suas funções e mecanismos de regulação serão abordados nos próximos tópicos.

1.4.1 ADAMs

As ADAMs (do inglês, *A Disintegrin And Metalloprotease*) são metaloproteinases envolvidas nas interações célula-célula de processos biológicos como adesão e fusão, sinalização e proteólise de citocinas, de receptores de citocinas e de componentes da MEC, dentre outras moléculas (SEALS e COURTNEIDGE, 2003).

A maioria das ADAMs são expressas como proteínas de superfície transmembranar tipo I com um domínio de metaloproteinase N-terminal, um domínio desintegrina que se liga a integrinas, um domínio rico em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF) seguido pelo

domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática. Algumas ADAMs podem apresentar algumas diferenças em sua estrutura, como a ADAM10 e ADAM17, que não possuem o domínio semelhante ao EGF, e nem domínio cisteína (TAKEDA, 2009). Há ainda, formas secretadas pertencentes a um grupo de ADAMs, as ADAMTSs, que se constituem de motivos trombospondina (TS), e também se ligam à MEC (PORTER et al., 2005) (Figura 3).

Geralmente estas metaloproteinases são sintetizadas como proenzimas, e são ativadas quando o prodomínio inibidor N-terminal é liberado por clivagem através da ação da furina convertase e/ou outras pró-proteínas convertases. Esta clivagem ocorre no trans-Golgi network (TGN) (GIEBELER e ZIGRINO, 2016), antes do transporte dessas proteínas à superfície celular. O domínio com íon zinco medeia a atividade proteolítica (HOUGAARD et al., 2000).

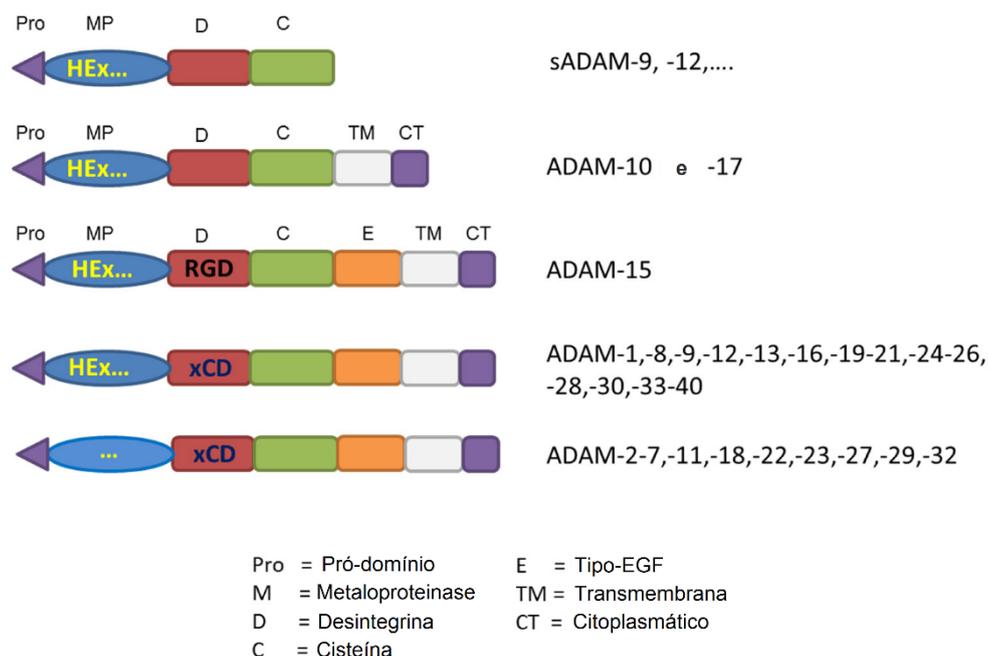


Figura 3. Diferença entre a estrutura dos domínios dos membros da família ADAM. Os membros da família ADAM possuem um pró-domínio que mantém o domínio metaloproteinase em sua forma latente, domínio catalítico metaloproteinase N-terminal que hidrolisa substratos protéicos, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio tipo-EGF e um domínio transmembrana. Modificado de Giebelier e Zigrino, 2016.

A proteína ADAM-10, juntamente com ADAM-17, é provavelmente, a mais importante α -secretase expressa fisiologicamente. A atividade α -secretase está presente no núcleo catalítico desta metaloprotease e cliva a proteína precursora amilóide (APP), ligantes ErbB (betacelulina - BTC, e EGF) e, ainda está envolvida na liberação (*shedding*) de proteínas de membrana tipo I e II por clivagem proteolítica (BAI et al., 2015) e na sinalização Notch (MARETZKY et al., 2005).

A via de sinalização Notch é uma via conservada e iniciada por uma família de proteínas que engloba quatro receptores (Notch1-4) e cinco ligantes (Jagged1 / 2, Dll-1/3/4). Os receptores Notch são ativados quando se ligam a um ligante expresso na membrana de uma célula adjacente. Em seguida, os receptores podem sofrer duas clivagens proteolíticas realizados por ADAM-10 e pelo complexo γ -secretase, respectivamente (QU et al., 2017). Os dois eventos proteolíticos resultam na liberação de uma forma intracelular ativa dos receptores que entram no núcleo, onde formam um complexo de ativação transcricional. Este complexo, promoverá a expressão de vários genes que coletivamente controlam a proliferação celular, morte celular, adesão, invasão e migração (DEMITRACK et al., 2017).

Em barreiras teciduais, ADAM-10 controla a expressão de proteínas que medeiam a adesão celular como VE-caderina (Caderina endotelial vascular) e E-caderina (caderina endotelial), permitindo a transmigração transiente de leucócitos (SCHULZ et al., 2008; DONNERS, 2010). Esta metaloprotease também regula moléculas de adesão como CXCL16 e CX3CL1 que medeiam a interação de linfócitos T e monócitos com células teciduais (HUNDHAUSEN et al., 2003). Através do *shedding* de várias proteínas transmembranares, promove a degradação da MEC, proteólise de CD44, de citocinas como TNF- α e de outras moléculas que coletivamente participam dos eventos de migração (SAHIN et al., 2004; NAGANO et al., 2004; LE GALL et al., 2009; Herzog et al., 2014).

ADAM-10 também pode regular a expressão de integrinas na superfície de leucócitos e favorecer a migração destas células. Em células mielóides, a deficiência de ADAM-10 está relacionada com a redução da expressão de integrinas, comprometimento da interação célula-matriz e rearranjo do

citoesqueleto, resultando em inibição da migração destes leucócitos em um modelo de inflamação pulmonar aguda (PRUESSMEYER et al., 2014).

Alguns tipos de células tumorais apresentam grande expressão de receptores para o fator de crescimento epidermal (EGFR do inglês, *epidermal growth factor receptor*) e para o fator de crescimento transformador (TGFR do inglês, *transforming growth factor receptor*) (PURBA et al., 2017). Estudos demonstram que ADAM-10 regula e ativa EGFR e TGFR- α e por isso poderia favorecer o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer (BAKKEN et al., 2009; MILLER et al., 2013; DURU et al., 2014). Além disso, inibidores de ADAM-10 utilizados em conjunto com terapias existentes (incluindo inibidores de tirosina quinase e trastuzumabe) potencializam a inibição do crescimento de células tumorais (DUFFY et al., 2009).

Em estudo feito por Kieseier e colaboradores (2003), foi observada expressão de ADAM-10 nos astrócitos e macrófagos presentes no cérebro de pacientes com esclerose múltipla após a morte. ADAM-10 também é super-regulada no líquido sinovial e articulações de pacientes com artrite reumatoide. Sua expressão está relacionada com a gravidade da doença e com a migração de monócitos para o sítio inflamatório (ISOZAKI et al., 2013). Pacientes com déficit cognitivo infectados por HIV, também apresentaram aumento na expressão de ADAM10 em seus astrócitos (MEGRA et al., 2017).

O papel da ADAM-10 em doenças inflamatórias e infecciosas ainda não é totalmente compreendido (DREYMUELLER et al., 2017). Desta maneira, são necessários mais estudos sobre suas funções e mecanismos de regulação nestas doenças, incluindo sua possível participação nos mecanismos de migração de leucócitos infectados por *T. gondii*.

1.4.2 Metaloproteinases de matriz

As Metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês *Matrix Metalloproteinases*) ou matrixinas são capazes de promover a clivagem de quase todos os componentes da matriz extracelular (MEC), tais como: colágeno, proteoglicanos, laminina, elastina e fibronectina. E estão envolvidas em processos fisiológicos como o remodelamento tecidual, angiogênese, desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e ciclo menstrual (BRINCKERHOFF e MATRISIAN, 2002; YOON et al., 2003; AMAR et al., 2017).

Além de processos fisiológicos, as MMPs estão relacionadas com processos patológicos nos quais a renovação da matriz extracelular (MEC) é anormal, como na artrite, aterosclerose, doenças infecciosas e câncer (AMAR et al., 2017). No desenvolvimento e progressão do câncer, por exemplo, além de degradar componentes estruturais da MEC, as MMPs estão envolvidas na sinalização celular, sendo capazes de ativar receptores celulares e fatores de crescimento ou liberá-los da MEC, regulando assim vários mecanismos celulares, incluindo crescimento, diferenciação, apoptose e migração (Figura 3) (HUA et al., 2011; TURUNEN et al., 2017).

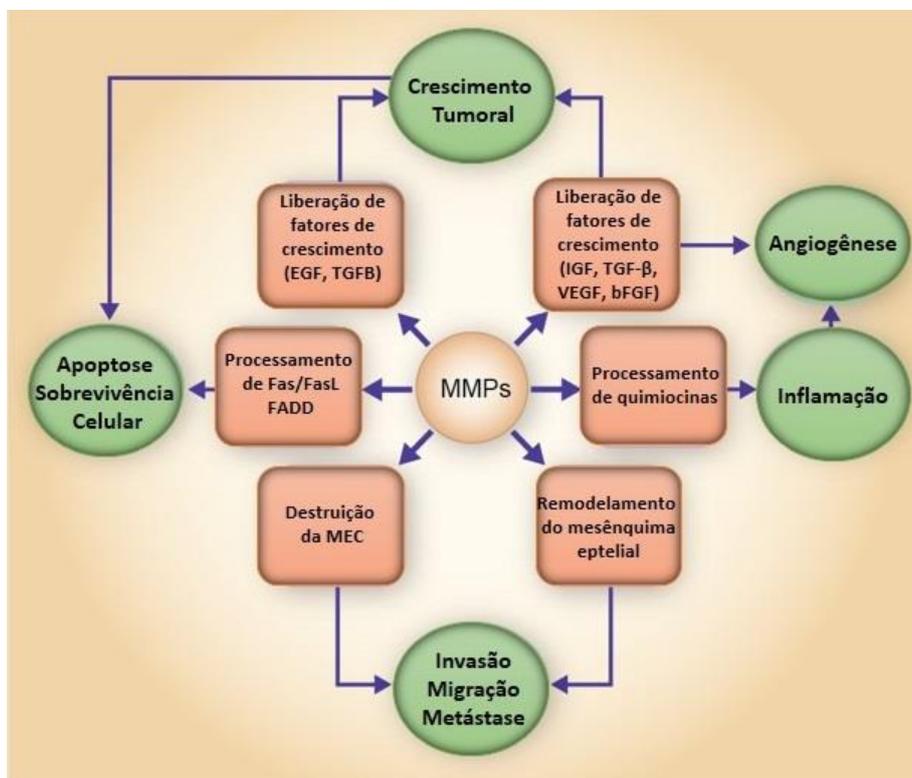


Figura 4. Papel das MMPs no câncer. As MMPs são freqüentemente super-expressas em uma variedade de tumores humanos. Elas podem degradar os componentes estruturais da matriz extracelular e também estão envolvidas no processamento de fatores de crescimento e receptores (EGF, TGF- β , sFlt-1, etc.), citocinas, quimiocinas e moléculas relacionadas a apoptose. Além disso, as MMPs participam na transição do epitélio mesenquimal. Portanto, as MMPs têm efeitos no crescimento celular e sobrevivência, angiogênese, inflamação, invasão e metástase. Modificado de Hua et al, 2011.

Estruturalmente as MMPs geralmente apresentam um peptídeo sinal que as direcionam ao retículo endoplasmático, um pró-domínio que mantém a enzima em sua forma latente, um domínio catalítico contendo o sítio de ligação ao zinco altamente conservado e um domínio hemopexina carboxi-terminal, o

qual liga a MMP ao seu substrato, à membrana celular ou aos inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (VISSE e NAGASE, 2003; MANZO et al., 2006; OWEN, 2008).

Do ponto de vista evolutivo, a família das MMPs possui diferentes grupos onde foram removidos ou incorporados alguns domínios. Assim, com base na organização de seus domínios, as MMPs podem ser classificadas em quatro grupos diferentes: MMPs arquetípicas, matrilisinas, gelatinases e MMPs ativadas por furina (Figura 4) (FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2010). Embora as MMPs sejam muitas vezes subdivididas em grupos com base nas diferenças na composição do domínio, há pouco consenso sobre como essas subdivisões devem ser atribuídas (PARKS et al., 2004).

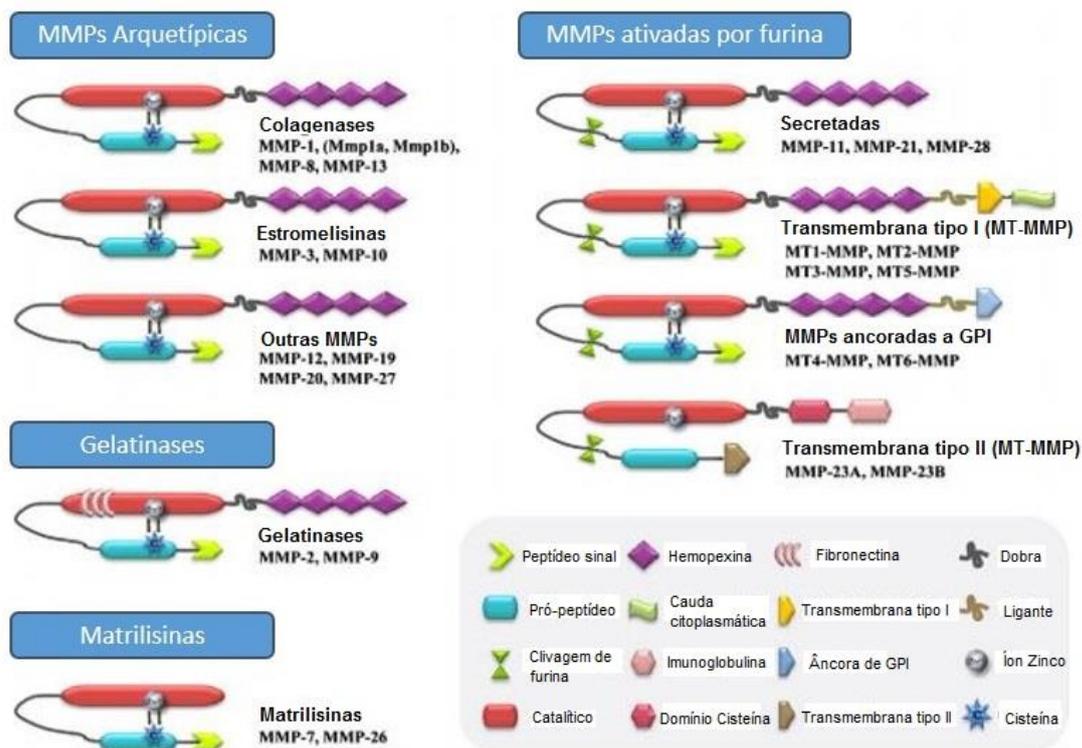


Figura 5. Metaloproteinases de Matriz de mamíferos. Classificação estrutural com base no arranjo dos domínios. Modificado de Fanjul-Fernandez et al., 2010.

Das 25 MMPs diferentes identificadas em vertebrados, 24 são encontradas em humanos (FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2010) e podem também ser separadas em dois grandes grupos: tipo solúvel, que são secretadas no espaço

pericelular, ou as transmembranas que são ancoradas por um domínio transmembrana ou por âncoras de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (ELKINGTON et al., 2005; MANSO et al., 2006). Com base na estrutura e especificidade ao substrato, as MMPs podem ser classificadas em vários subgrupos: collagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -7, -10, -11, -12, -26), MMPs associadas a membrana (MT-MMPs, MT-MMP-14, -15, 16 e -17, -24 e -25) e MMPs não classificadas (-20, -21, -23, -27, -28) (HUA et al., 2011).

As MMPs secretadas são sintetizadas em sua forma latente (zimogênio) e liberadas pelas células como pró-MMP, o que requer ativação extracelular feita por outras MMPs, serinoproteases (via plasmina, p.ex.), dentre outras moléculas. Esta ativação pode ocorrer pela clivagem da interação zinco-cisteína no pró-peptídeo N-terminal (conhecido como *switch* cisteína). Além disso, algumas MMPs são pré-ativadas no interior da célula e atingem a superfície celular já ativas (VISSE e NAGASE, 2003; RYDLOVA et al., 2008).

Diferente dos outros membros da família MMP, as MT-MMP não são secretadas e permanecem ancoradas à superfície celular após ativação. Todas as MT-MMPs apresentam uma sequência de reconhecimento de furina na extremidade C-terminal do pró-peptídeo. De forma similar às secretadas, as MT-MMPs são sintetizadas como pró-enzimas inativas, porém, são expressas na superfície da célula como enzimas ativas localmente. Sua ativação ocorre, principalmente, intracelularmente pela clivagem mediada pela furina convertase no pró-domínio dentro do trans-Golgi network, antes de serem transportadas para a superfície celular (STAWOWY et al., 2004; MANSO et al., 2006; OWEN, 2008).

Estudos demonstram que estas MMPs ancoradas a membrana são super-expressas em vários tipos de câncer e estão envolvidas na modulação da comunicação celular e sinalização intracelular como resultado da alteração de receptores, ligantes e moléculas de adesão, ou liberação de fatores de crescimento no microambiente tumoral (KESSENBROCK et al., 2010; ITOH, 2006). Com base nessas atividades, as MT-MMPs exercem um papel dinâmico no câncer e são capazes de controlar a plasticidade celular fenotípica destas células (STRONGIN, 2010; TURUNEN et al., 2017).

A MT-MMP mais estudada e associada ao câncer é a MT1-MMP. Carcinomas de mama, próstata e estroma, dentre outros tipos de câncer, apresentam expressão aumentada desta molécula (TURUMEN et al., 2017). Além das células tumorais malignas, macrófagos, neutrófilos, DCs e células endoteliais também expressam MT1-MMP em processos inflamatórios em resposta a TNF- α e IL-12 (CHUN et al., 2004; SAKAMOTO e SEIKI, 2009). Sua função envolve degradação do colágeno tipo I pericelular, o que, por si só, é considerado suficiente para permitir a invasão celular. Além disso, pode ativar proMMP-2, proMMP-9 e clivar um grande número de proteínas e receptores da superfície celular, tais como CD44, ADAMs e integrinas (BACIU et al., 2003; MANSO et al., 2006).

O aumento da expressão de MMPs pode favorecer a disseminação de macrófagos infectados por *T. gondii* e dotá-los de um fenótipo similar ao metastático (SEIPEL et al., 2010; SCHUINDT et al., 2012). Nosso grupo demonstrou que a infecção *in vitro* de macrófagos murinos induz aumento da expressão da metaloproteinase de matriz tipo 1 de membrana (MT1-MMP ou MMP-14). Além disso, a forma ativa da metaloproteinase de matriz extracelular tipo 9 (MMP-9) está aumentada no sobrenadante destas células infectadas (SEIPEL et al., 2010). O aumento da secreção de MMP-9 e -2 através da via Erk1/2/NF- κ B também foi observada em mastócitos murinos infectados com este parasita (WANG et al., 2016).

As MMPs ativadas após infecção de macrófagos parecem estar envolvidas com a maturação da integrina $\alpha 5\beta 3$, a qual participa de mecanismos de migração e invasão celular (SEFTOR et al., 1992), uma vez que, na presença de um inibidor de MMPs, macrófagos infectados por *T. gondii* falham em expressar $\alpha 5\beta 3$ (SEIPEL et al., 2010). A MT1-MMP pode ser uma via preferencial para processamento das subunidades pró-integrina em macrófagos infectados com *T. gondii*, por apresentar esta função bem caracterizada em diferentes tipos celulares (BORRIRUKWANIT et al., 2014)

Schuindt e colaboradores (2012) demonstraram que a MMP-9 forma complexos multi-proteicos com o receptor ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR), inibidor tecidual de metaloproteinase-1 (TIMP- 1) e a

glicoproteína de superfície celular (CD44), no sobrenadante de macrófagos murinos infectados, sugerindo semelhanças entre os comportamentos migratórios de células infectadas por *T. gondii* e tumores metastáticos (NAGANO et al., 2004; CHO et al., 2012; STRONGIN, 2010).

Em humanos, macrófagos infectados por *T. gondii* apresentam altos níveis de MT1-MMP, com diminuição das formas inativas de MMP-9 e MMP-2 (pro-MMP-2 e pro-MMP-9) (BUACHE et al., 2007; NIEHUS et al., 2012). Astrócitos infectados também apresentam aumento na secreção de MMP-2 e MMP-9, com consequente degradação de fibronectina, podendo contribuir para a migração de leucócitos durante a encefalite toxoplasmática (LU e LAI, 2013). Em gestantes, os níveis séricos de MMP-2 e -9 são maiores no sangue e no cordão umbilical de mulheres infectadas, e estão relacionados à transmigração do *T. gondii* pela barreira placentária (WANG e LAI, 2013).

Na infecção crônica, as células T das linhagens CD4 + e CD8 + são essenciais para controlar cistos contendo bradizoítos no cérebro. Células T expressando MMP-10 são encontradas no cérebro de camundongos 21 dias após infecção, enquanto as células T que expressam MMP-8 são observadas no 28º dia de infecção. Ao mesmo tempo, astrócitos expressam TIMP-1, provavelmente como resultado de uma reação do sistema imune para controlar o dano tecidual (CLARK et al., 2010). A presença de TIMP-1 no cérebro durante o estágio crônico da toxoplasmose pode ser um indicativo do controle da resposta exacerbada causada pela alta expressão de MMPs, bem característica em diversas condições inflamatórias do SNC (DUBOIS et al., 1999; THWAITES et al., 2003; DHANDA e SANDHIR et al., 2017).

As MMPs são reguladas de muitas maneiras, incluindo regulação por mecanismos de oligomerização ao nível da membrana plasmática, para que sejam efetuadas as reações de clivagem das formas pró-proteína em proteína ativa enzimaticamente. Entre os facilitadores destas interações está a molécula CD147, também conhecida como EMMPRIN ou basigina (SEIZER et al., 2010) que pode ser uma forte candidata na regulação das MMPs expressas em leucócitos infectados por *T. gondii*.

1.4.3 CD147

A CD147 foi originalmente caracterizada como um fator presente nas células de câncer de pulmão, que estimulava a produção da colagenase MMP-1 e aumentava os níveis de MMP-2 e -3, e por esta função, recebeu o nome de EMMPRIN (do inglês, *extracellular matrix metalloproteinase inducer*) (BISWAS et al., 1995). Estudos subsequentes demonstraram que EMMPRIN era idêntico a outras proteínas, incluindo a basigina (Bsg) (DECASTRO et al., 1996) e antígeno associado ao hepatoma (HAb18G) (CHENG, et al., 1994), os quais agora são comumente denominados CD147 (GRASS e TOOLE, 2016).

Estruturalmente, CD147 é uma glicoproteína transmembrana tipo I de cadeia simples com dois domínios imunoglobulinas, pertencente então, à superfamília das imunoglobulinas (Ig). Além dos domínios imunoglobulinas, nomeados EC1 e EC2, que ficam na porção extracelular, possui regiões de ligação e domínios transmembranar (TM) e citoplasmático (Figura 6). As regiões de ligação, TM e citoplasmáticas são altamente conservadas, mas os domínios Ig podem variar entre espécies (SCHLEGEL et al., 2009; GRASS e TOOLE, 2016).

Cada domínio apresenta interações específicas, visto que foram identificadas diferentes proteínas interagindo com cada um deles. O domínio EC1, por exemplo, está envolvido na ativação de MMPs (MMP-1, -2, -3 e -9, bem como MT1-MMP e MT2-MMP), oligomerização de integrinas, CD44 e de CD98 (glicoproteína TM envolvida na adesão e no transporte de aminoácidos) (NABESHIMA et al., 2006; YURCHENKO et al., 2010). O domínio EC2 se liga a ciclofilinas, integrinas e caveolina-1 (importantes na quimiotaxia e adesão) (TANG et al., 2004; YURCHENKO et al., 2010). O domínio TM também se liga à ciclofilinas e provavelmente envolve interações com CD43, sindecan-1 e integrinas (envolvidas na adesão) (PAKULA et al., 2007; KHUNKAEWLA et al., 2008). Além disso, tanto o domínio TM quanto o citoplasmático interagem com transportadores de monocarboxilato (MCTs), promovendo o transporte de piruvato e lactato (Figura 6) (KAUSHIK et al., 2015).

Estas interações estão relacionadas com funções de migração, vias de sinalização celular, transporte de nutrientes e fármacos, e por isso, a expressão de CD147 pode influenciar mecanismos de migração fisiológicos e patológicos

(MURAMATSU et al., 2015). Estudos demonstram que CD147 é expresso em muitas células epiteliais, neuronais, linfóides e mielóides (GRASS e TOOLE, 2016), em tecidos saudáveis a expressão é principalmente restrita ao trato reprodutivo, cérebro, olhos e músculos (NAKAI et al., 2006).

Estudos em camundongos *knockout* (*bsg* - / -) revelaram que a maioria morre no início do desenvolvimento embrionário (NAKAI et al., 2006). Nos raros casos em que o embrião se desenvolve, os descendentes são pequenos e geralmente morrem antes de um mês devido à dificuldade respiratória secundária e

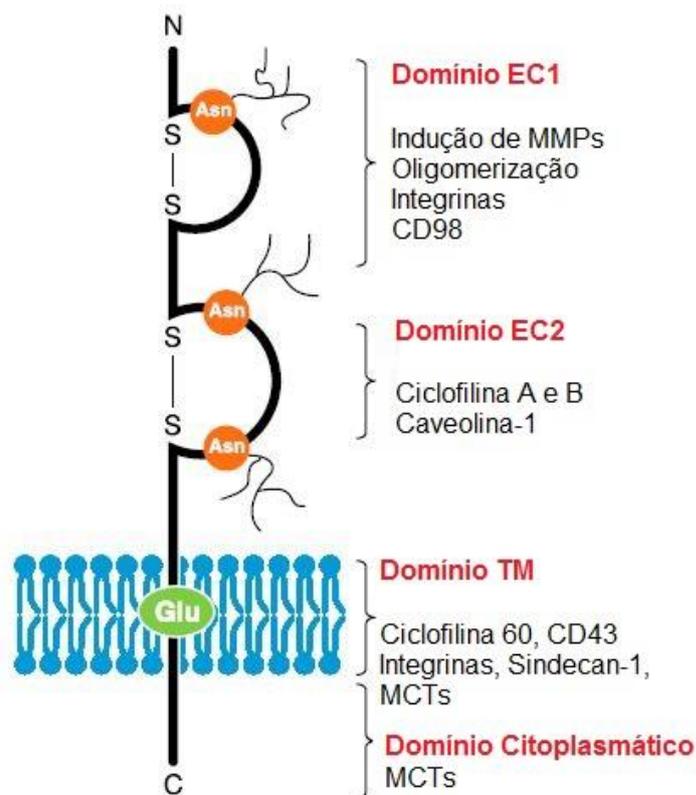


Figura 6. Estrutura de CD147. CD147 possui 3 regiões com resíduos de asparagina (Asn) na região extracelular (EC), uma região TM contendo um resíduo de ácido glutâmico altamente conservado (Glu), e uma pequena cauda citoplasmática. A região EC pode ser dividida em 2 *loops* tipo Ig (EC1 e EC2), mantidos em conjunto por ligações dissulfeto. Cada Domínio de CD147 interage com diferentes proteínas, sendo assim, possui diferentes funções. Modificado de Hahn et al., 2015.

pneumonia intersticial. Os machos sobreviventes são estéreis devido a defeitos na espermatogênese (NAKAI et al., 2006; BI et al., 2013) e as fêmeas têm

problemas na fertilização (IGAKURA et al, 1998). Além disso, estes animais exibem anormalidades na aprendizagem espacial, memória e percepção sensorial a estímulos dolorosos e odores nocivos (IGAKURA et al, 1996), na função retiniana com cegueira precoce (OCHRIETOR et al., 2002), no desenvolvimento dentário (XIE et al., 2015) e nas respostas imunológicas (JOGHETAIEI et al., 2011; PAYNE et al., 2012; GE et al., 2015; MAEDA et al., 2015).

A CD147 é regulada em vários tipos de câncer, e a alta concentração nos tumores dos pacientes oncológicos está relacionada com um mau prognóstico (ISHIBASHI et al., 2004; NABESHIMA et al., 2006; LI et al., 2009). Esta proteína transmembrana demonstrou promover múltiplos estágios de progressão tumoral, tais como: proliferação, invasividade e metástase, via indução de MMPs (KANEKURA et al., 2002; CHEN et al., 2006; XIN et al., 2016); angiogênese, estimulando a produção de VEGF (ZONG et al., 2016); crescimento independente de ancoragem (MARIEB et al., 2004); quimorresistência (TOOLE et al., 2008); e efluxo de lactato (SCHNEIDERHAN et al., 2009). Com todos esses papéis no crescimento e biologia do tumor, cada vez mais grupos estão explorando e compreendendo o benefício do uso de anticorpos anti-CD147 como potencial terapia tumoral (CHICHE et al., 2013).

Em modelos experimentais, CD147 também demonstrou estar envolvida em muitas doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, esclerose múltipla e fibrose renal (YURCHENKO et al., 2010). Nestas doenças, a principal função de CD147 é aumentar a migração de leucócitos inflamatórios via interação com ciclofilina e E-selectin promovendo o consequente dano tecidual (YURCHENKO et al., 2010; MURAMATSU et al., 2015; KOSUGI et al., 2014).

CD147 também desempenha papel crítico em doenças infecciosas. Ela pode facilitar a infecção pelo HIV-1 através da interação com ciclofilina-A associada ao vírus, pode ser um receptor do vírus do sarampo em células epiteliais por interação com a ciclofilina-B (PUSHKARSKY et al., 2007) e aumentar a invasão intracelular de *Listeria monocytogenes* por supressão de NOD2 (TILL et al., 2008). Além disso, é uma proteína essencial para a invasão de eritrócitos pelo *Plasmodium falciparum*, parasita pertencente ao filo Apicomplexa (mesmo do *T. gondii*), causador da malária (CROSNIER et al., 2011).

A invasão de eritrócitos é central para a patogênese da malária, e a RH5 é a única proteína do parasita que é essencial para invasão por todas as cepas. A proteína que interage com RH5 é a CD147 (CROSNIER et al., 2011) e a estrutura precisa do complexo, revela resíduos de aminoácidos em RH5 essenciais para ligação a CD147 (FORNI et al., 2015).

Em conjunto, o conhecimento das funções de CD147 em processos fisiológicos e patológicos a torna atrativa para estudos sobre seu possível papel na invasão e migração do *T. gondii*, podendo contribuir na travessia de leucócitos infectados pelas barreiras teciduais e na patologia da fase aguda da doença.

2. Justificativa

O *Toxoplasma gondii* desenvolveu com sucesso estratégias para evadir a resposta imune do hospedeiro e acessar sítios imunoprivilegiados, como cérebro e retina, onde permanece em um ambiente controlado dentro de cistos quiescentes. Acredita-se que a capacidade deste parasita em infectar leucócitos e utilizá-los como “Cavalos de Tróia”, seja determinante para o acesso a estes tecidos, uma vez que após infecção, macrófagos e células dendríticas apresentam um fenótipo hipermigratório e são capazes de atravessar barreiras teciduais.

Nosso grupo recentemente demonstrou que metaloproteinases podem estar envolvidas na migração de macrófagos infectados por *T. gondii*, visto que a infecção *in vitro* de macrófagos murinos induz aumento da expressão de MT1-MMP e ADAM-10 nestas células, além de aumentar a concentração de MMP-9 ativa no sobrenadante (SEIPEL et al., 2010).

Apesar das Metaloproteinases, como ADAM-10 e MT1-MMP, serem super-expressas em macrófagos infectados, ainda é necessário caracterizar o perfil de expressão, as vias de ativação dos zimogênios e as funções destas moléculas nos mecanismos de migração / invasão. Além disso, a proteína CD147 pode estar envolvida na regulação das metaloproteinases, de moléculas de adesão e fatores de crescimento, desempenhando funções similares a metástase nos macrófagos infectados.

Em conjunto, as proteínas ADAM-10, MT1-MMP e CD147 são fortes candidatas a desempenharem funções na migração de macrófagos infectados por *T. gondii*, principalmente devido a seus múltiplos papéis em diferentes processos fisiológicos e patológicos (Tabela 1). Deste modo, ao caracterizar o perfil de expressão, determinar as vias de processamento e avaliar a importância destas moléculas para a migração de macrófagos infectados em matriz extracelular tridimensional, poderemos contribuir com informações para a melhor compreensão da relação *T. gondii*-hospedeiro.

Tabela 1. Múltiplas Funções de ADAM-10, MT1-MMP e CD147 em processos fisiológicos e patológicos.

| ADAM-10 | MT1-MMP | CD147 |
|---|---|---|
| <i>Shedding</i> de proteínas transmembranares | <i>Shedding</i> de proteínas transmembranares | <i>Shedding</i> de proteínas transmembranares |
| Envolvida na sinalização Notch em conjunto com γ -Secretase | Degradação de colágeno tipo I | Ativa MMP-1, -2, -3 e -9, MT1-MMP e MT2-MMP |
| Regula moléculas de adesão em tecido endotelial e epitelial | Ativa MMP-2 e 9 | Regula moléculas de adesão e fatores de crescimento |
| Regula expressão de integrinas, CD44 | Regula expressão de integrinas, CD44, ADAMs e fatores de crescimento | Regula expressão de integrinas |
| Regula fatores de crescimento | Regulada por furina-convertase | Receptor HIV, sarampo, <i>Plasmodium falciparum</i> |
| Super- expressa em alguns tipos de câncer, artrite reumatóide, esclerose múltipla | Super- expressa em alguns tipos de câncer e leucócitos em processos inflamatórios | Super- expressa em alguns tipos de câncer, artrite reumatóide, esclerose múltipla |

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento de MT1-MMP, ADAM-10, CD147 na migração de macrófagos murinos infectados por *T. gondii*.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o perfil de expressão de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 em macrófagos murinos infectados por *T. gondii*;
- Determinar qual o envolvimento das vias de furina convertase e γ -secretase no processamento de zimogênios de MT1-MMP, ADAM-10 e na expressão de CD147;
- Avaliar a influência da inibição das vias de furina convertase e γ -secretase na capacidade invasiva/migratória de macrófagos infectados em matriz extracelular tridimensional;
- Reduzir/inibir a expressão de MT1-MMP e CD147 na superfície dos macrófagos infectados através do silenciamento gênico transiente utilizando siRNAs específicos;
- Analisar o envolvimento de CD147 na ativação de MT1-MMP em macrófagos infectados após silenciamento gênico;
- Avaliar a capacidade invasiva/migratória de macrófagos murinos infectados após silenciamento gênico em matriz extracelular tridimensional;

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Para a realização da infecção experimental, foram utilizados camundongos suíços (*Swiss webster*) fêmeas da linhagem CF1 com idade de 3 a 5 semanas. Os animais foram disponibilizados pelo biotério central da UENF. Neste trabalho, todos os experimentos realizados com animais de laboratório foram feitos estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Uso e Experimentação Animal da UENF (protocolo CEUA 292) (anexo).

4.2 Anticorpos utilizados

Para análise das moléculas de interesse através da microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, foram utilizados anticorpos primários IgG policlonais de cabra: MT1-MMP (sc-12366), ADAM-10 (sc-16523) e CD147 (sc-9757) (Santa Cruz *Biotechnology*) em diluição de 1:100 com PBS/BSA 1%. O anticorpo primário anti-*T. gondii* (cedido pelo prof. Renato DaMatta) foi utilizado na diluição de 1:1000 em PBS/BSA 1%. Este anticorpo foi obtido de camundongos suíços cronicamente infectados com a cepa ME 49 através da punção cardíaca e consequente centrifugação para separação das hemácias e soro. Anticorpos secundários suíno anti-IgG de cabra conjugados a Alexa Fluor® 568 (Thermo Fisher Scientific), cabra anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (Merk) e suínos anti-IgG de cabra conjugado a biotina (CALTAG) foram diluídos na proporção de 1:500 em PBS/BSA 1%. Streptoavidina conjugada a PE-Cy 5™ (ficoeritrina e corante de cianina - BD Biociences), 1:500, foi utilizada para a citometria de fluxo.

4.3 Condições de cultura para Raw 264.7

A linhagem de macrófago murino, Raw 264.7, foi cultivada em meio RPMI 1640 + L-glutamina 2 mM + FCS a 10% (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, BRL) em frascos de cultivo de 75cm² (Kasvi). A cultura foi replicada a cada 2 dias ou quando as células que formavam a monocamada atingiam aproximadamente 80% de confluência. As culturas foram mantidas em estufa (*Scientific Inc.*, modelo 3159) a 37°C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

4.3 Obtenção de *T. gondii* para infecção *in vitro*

Taquizoítos, da linhagem RH (Sabin e Feldman, 1948), foram mantidos por passagens sucessivas na cavidade peritoneal de camundongos suíços com idade entre 3-5 semanas no infectório do LBCT (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual) na UENF, sob supervisão do prof. Renato DaMatta. Após o período de 48 h, o lavado peritoneal foi realizado com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) para obtenção dos parasitas. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensão em 1 ml de meio RPMI 1640 com 10% SFB (Gibco, BRL), pH 7,2. Uma alíquota foi retirada e os parasitas corados com azul de Trypan para verificar viabilidade. A quantificação foi feita em câmara de Neubauer, e na sequência a concentração ajustada na proporção de três parasitas por célula (3:1).

4.4 Infecção *in vitro*

Os macrófagos foram recuperados em 10 ml de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por raspagem com raspador de cultura (SPL *Life Sciences*). O material coletado foi centrifugado a 500 x g, por 10 min e o *pellet* ressuspensão no referido meio. Uma alíquota foi diluída em Azul de Trypan (0,2%) para quantificação em câmara de Neubauer.

Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 1x10⁶ células/ml em placas de 24 poços (Greiner bio-one) para todos os ensaios propostos. Para

a microscopia de fluorescência foram inseridas nos poços, lamínulas circulares estéreis de 13 mm (Glasscyto) antes do plaqueamento. Para o ensaio de migração (*transwell*) foram inseridas câmaras com membranas *transwell* com camada uniforme de Matrigel™ (Realce) antes do plaqueamento. Todas as placas foram mantidas por 12 h (*overnight*) em estufa (Forma Scientific) a 37 °C com 0,5% de CO₂ e umidade controlada.

Após 12h, macrófagos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* na proporção de três parasitas (Total de 3×10^6 parasitas/ml) por macrófago (3:1), durante 1 h. Decorrido o tempo de infecção, o meio de cultura foi retirado de todos os poços e os mesmos lavados cuidadosamente três vezes com PBS estéril para remoção dos parasitas livres. Após lavagem, foram realizados os protocolos com inibidores ou siRNAs.

4.5 Inibidores de Furina e γ -secretase

Para analisar as possíveis vias de sinalização envolvidas na mobilização de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 para a superfície celular e a função destas vias no mecanismo de migração/invasão, foram utilizados inibidores de furina convertase II (C₃₆H₇₅N₂₅O₆) (Calbiochem) e γ -secretase (C₂₃H₂₆F₂N₂O₄) (DAPT - Sigma). Estes inibidores foram acrescentados às culturas 1h após a infecção *in vitro* de *T. gondii* nos diferentes ensaios, conforme descrito no item 4.4, na concentração de 2 μ M do inibidor de furina e 20 μ M do inibidor de γ -secretase, após diluição das soluções estoque em meio RPMI (As concentrações foram selecionadas após ensaio com MTT descrito no item 4.7). Para todos os experimentos com inibidores foram utilizados como controles macrófagos infectados com *T. gondii* e não infectados, e macrófagos não infectados com tratamento com inibidores. Os ensaios com inibidores foram realizados após 24 horas de tratamento.

4.6 Silenciamento gênico utilizando siRNA em macrófagos murinos infectados por *Toxoplasma gondii*

4.6.1 Reagentes para silenciamento gênico utilizando siRNAs

Os siRNAs de interferência (do inglês, *short interfering RNAs*) e todos os reagentes utilizados, foram adquiridos da empresa *Santa Cruz Biotechnology*. O siRNA de MT1-MMP (sc-41566) e o siRNA de CD147 (sc-35299) são um conjunto de 3 siRNAs de 19-25 nucleotídeos específicos para silenciar os respectivos alvos em células de camundongos. Os frascos continham 3.3 nmol de siRNA liofilizado, nos quais foi preparada uma solução estoque de 10 μ M, após adição de tampão de diluição de siRNA (sc-29527), as soluções foram mantidas a 20 °C. Além dos siRNAs específicos, foi utilizado siRNA não específico conjugado a FITC (sc-36869) a fim de determinar a eficiência da transfecção por microscopia de fluorescência e siRNA-A não específico (sc-37007) para os testes de viabilidade e como controles.

Reagentes lipídicos são utilizados para aumentar o acesso dos siRNAs ao interior das células, contribuindo para o sucesso do silenciamento gênico (Barbosa & Lin, 2004). Neste trabalho, foi utilizado o reagente de transfecção lipídico (sc-29528), para aumentar a eficiência da transfecção dos siRNAs para MT1-MMP, CD147 e dos siRNAs controle. O meio de transfecção (sc-36868) foi utilizado para o preparo de todas as soluções.

4.6.2 Padronização da transfecção de siRNA em Raw 264.7

Tendo como base o protocolo de transfecção disponibilizado pela *Santa Cruz Biothechnology*, desenvolvemos um protocolo de silenciamento para a linhagem de macrófago Raw 264.7 infectadas por *T. gondii* utilizando o siRNA FITC controle a fim de determinar qual seria a concentração de siRNA e reagente de transfecção necessários para uma transfecção mais eficiente.

Macrófagos Raw 264.7 foram plaqueados e infectados nas condições descritas no item 4.4. Após 4 horas de infecção, o meio contido nos poços foi descartado

e substituído por meio de transfecção. Enquanto as células estavam incubadas com meio de transfecção, foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução A: Meio de transfecção + siRNA FITC. Concentração final de siRNA utilizada: 0,2 μ M ou 0,4 μ M ou 0,8 μ M
- Solução B: meio de transfecção + reagente de transfecção. Concentração final do reagente de transfecção utilizada: 0,2 μ M ou 0,4 μ M.

Após preparo das soluções, a solução com siRNA FITC (Solução A) foi adicionada à solução contendo reagente de transfecção (Solução B) e a mistura foi incubada durante 1 hora em temperatura ambiente. Deste modo, foram produzidas 6 soluções AB: 0, 2 μ M A + 0,2 μ M B; 0,4 μ M A + 0,2 μ M B; 0,8 μ M A + 0,2 μ M B; 0,2 μ M A + 0,4 μ M B; 0,4 μ M A + 0,4 μ M B; 0,8 μ M A + 0,4 μ M B.

No decorrer do tempo de 1h de incubação das soluções AB, os macrófagos plaqueados foram lavados duas vezes com meio de transfecção. Após lavagem, o meio de transfecção foi descartado dos poços e a solução AB adicionada. Após 4 horas da adição da solução AB, lâminas foram montadas e observadas através da microscopia de fluorescência. Imagens foram obtidas através da câmera AxioCam utilizando o microscópio Axioplan - Carl Zeiss.

4.6.3 Transfecção utilizando siRNAs específicos para MT1-MMP e CD147

Ao padronizar a metodologia de transfecção, todos os experimentos utilizando siRNAs específicos para MT1-MMP e CD147 foram feitos nas condições descritas como se segue:

Os macrófagos foram plaqueados e infectados como descrito no item 4.4. Após 4 horas de infecção, o meio contido nos poços foi descartado e substituído por meio de transfecção. Enquanto as células estavam incubadas com meio de transfecção, foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução A: 250 μ l de meio de transfecção + 20 μ l siRNA para MT1-MMP ou CD147. Concentração final de siRNAs utilizada: 0,8 μ M
- Solução B: 250 μ l de meio de transfecção + 20 μ l reagente de transfecção. Concentração final do reagente de transfecção utilizada: 0,4 μ M

Após preparo das soluções, a solução A foi adicionada a solução B, e a solução AB foi incubada durante 1 hora em temperatura ambiente. No decorrer do tempo de 1h de incubação com a solução AB, os macrófagos plaqueados foram lavados duas vezes com meio de transfecção. Após lavagem, o meio de transfecção foi descartado dos poços e a solução AB adicionada. Deste modo, a solução AB foi adicionada nos poços 6h após infecção de *T. gondii*. Após 4 horas de incubação, a solução AB foi retirada dos poços e substituída por meio RPMI suplementado com 20% de SFB.

Após 18 horas da adição da solução AB nos poços (24 h de infecção), foi avaliada a expressão de MT1-MMP e CD147 nos macrófagos infectados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

Para todos os experimentos com siRNAs foram utilizados como controles: macrófagos infectados com *T. gondii* e não infectados sem tratamento com siRNAs, e macrófagos não infectados com tratamento com siRNAs. Foram realizadas triplicatas em três ocasiões independentes.

4.7 Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT após tratamento com siRNA-A e com inibidores de furina e γ -secretase.

A viabilidade das células Raw 264.7 infectadas por *T. gondii* após tratamentos utilizando siRNA-A (controle negativo) e inibidores foi avaliada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, M2128). Tal metodologia foi descrita por Mosmann (1983), e consiste na redução do MTT a formazam, composto de cor púrpura, pela succinato desidrogenase mitocondrial.

O siRNA controle (sc-37007) foi utilizado para verificar se a metodologia padronizada e descrita no item 4.6.3 poderia interferir na viabilidade celular. Este siRNA é um controle negativo para experimentos de transfecção, que consiste em uma sequência codificada que não conduzirá à degradação específica de qualquer mensagem celular.

O inibidor de furina convertase foi utilizado nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M e o inibidor de γ -secretase nas concentrações de 20 μ M e 40 μ M, a

fim de determinar a concentração a ser utilizada em todos os experimentos subsequentes.

Após 18 horas de transfecção ou 24 horas do tratamento com inibidores, foram adicionados 50 μ L de MTT (Sigma, 5 mg/mL) para 500 μ L de cultivo em cada poço. As placas foram mantidas na estufa por 4 horas. Após esse período foram retirados 450 μ L do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 250 μ L de uma solução de ácido clorídrico com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados.

A placa de 24 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram analisados através da avaliação da absorbância de cada poço e os experimentos realizados em triplicatas.

4.8 Análise da expressão de MT1-MMP, CD147 e ADAM-10 por microscopia de fluorescência

Para todos os experimentos de microscopia de fluorescência foram inseridas nos poços das placas, lamínulas circulares estéreis de 13 mm (Glasscyto) antes do plaqueamento dos macrófagos. As amostras não tratadas ou as tratadas com siRNAs e inibidores, bem como os controles não infectados, foram fixadas em solução de paraformaldeído a 1% durante 30 min. Na sequência, foram lavadas por três vezes com PBS e bloqueadas com solução de PBS com cloreto de amônio (50 mM) por mais 30 min. Após esse tempo, as amostras foram lavadas três vezes com solução de PBS suplementado com 1% de albumina de soro bovino (BSA) (SIGMA).

Anticorpos primários específicos (anti-MT1-MMP ou anti-ADAM-10 ou anti-CD147 descritos no item 4.2) foram adicionados à amostra. Após 1 hora, as amostras foram lavadas por três vezes, e incubadas por mais 1 hora com anticorpo anti-*T. gondii* (item 4.2). A utilização do anticorpo anti-*T. gondii* foi feita apenas para os experimentos de cinética em macrófagos infectados.

Posteriormente, após três lavagens com PBS/BSA 1%, o anticorpo secundário suíno anti-IgG de cabra conjugados à Alexa Fluor 568 (item 4.2) foi adicionado. Para os experimentos de cinética, após período de incubação (1 h)

e lavagens, amostras também receberam anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (item 4.2).

Para a incubação das amostras com os anticorpos, foi colocado uma folha de parafilme sobre a tampa de uma placa de 24 poços, e 50 µl de cada um dos anticorpos adicionados sobre esta tampa previamente envolta pelo parafilme. Na sequência, as lamínulas contendo as amostras foram retiradas dos poços e colocadas em contato direto com os anticorpos. Após 1h de incubação com cada anticorpo, as lamínulas retornavam aos poços, onde eram lavadas por três vezes com PBS/BSA 1%.

Ao final das lavagens, as lamínulas foram retiradas da placa e coladas, com a face superior voltada para baixo, por meio de 10 µl de solução anti-desbotamento Prolong™ Gold com DAPI (Life Technologies) em lâminas, previamente limpas em álcool 70%. As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 24 horas.

Decorrido este tempo, as lamínulas foram observadas utilizando o microscópio óptico Axioplan (Zeiss), em objetiva de 40 X e 100 X. As imagens digitais foram capturadas com uma câmera AxioCam Mrc5 (Axiovision system - Zeiss) e sobrepostas utilizando o *software* do microscópio *AxioVision*. Para cada lamínula observada, foram fotografados 05 campos aleatórios em três experimentos independentes.

Esta metodologia foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, com a colaboração do prof. Renato DaMatta.

4.8.1 Mensuração da fluorescência de MT1-MMP, CD147 e ADAM-10

Todas as imagens sobrepostas foram analisadas no *software ImageJ* (v1.51g, NIH), a fim de quantificar os níveis de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 nos macrófagos. As imagens obtidas com objetiva de 40 x foram trabalhadas nas seguintes condições: Inicialmente, utilizando a ferramenta *image – color - Split channels*, foram produzidas imagens em 8 bit com os filtros vermelho, verde e azul. A imagem com filtro vermelho foi selecionada, visto que todas as proteínas de interesse são detectadas no filtro vermelho. Na sequência, cada célula foi

selecionada utilizando a ferramenta *freehand selections*. Após esboço feito contornando a célula, foram mensuradas a área, a fluorescência média e a densidade integrada através da ferramenta *analyze – measure* (Figura 7). Além disso, foram selecionadas e mensuradas regiões próximas às células, que não possuíam fluorescência (*background*), como controle negativo.

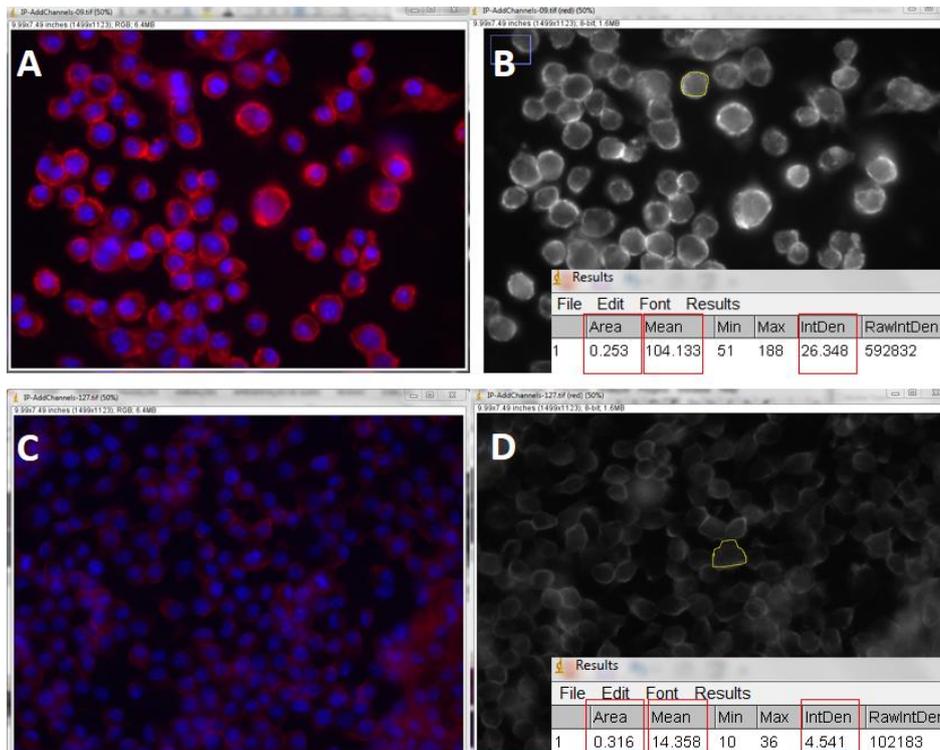


Figura 7. Imagem representativa da análise realizada no ImageJ para quantificar fluorescência. A e C) Imagens sobrepostas obtidas por microscopia em aumento de 40x. B e D) Imagens geradas após seleção do canal vermelho de interesse (8 bit); célula selecionada; mensuração da área, média de fluorescência e densidade integrada. A e B) expressão de CD147 em macrófagos infectados. C e D) expressão de CD147 em macrófagos não infectados.

A partir destes dados, a fluorescência celular corrigida total (TCCF) foi calculada com a seguinte fórmula:

$TCCF = \text{densidade integrada} - (\text{área da célula selecionada} \times \text{média de fluorescência do } background).$

Para cada tratamento, foram selecionadas 5 imagens obtidas de 3 experimentos independentes. Para cada imagem foram escolhidas de maneira

aleatória 8-10 células, de modo que, para cada tratamento foram feitos cálculos de TCFE em 25-40 células. Os gráficos e a análise estatística (testes t de *Student* não paramétrico bicaudal) foram realizados utilizando GraphPad Prism 5.

A mensuração da fluorescência foi realizada com base nos seguintes trabalhos: Burgess et al., 2010; Gavet e Pines, 2010; Potapova et al., 2011; McCloy et al., 2014.

4.9 Análise da expressão de MT1-MMP por Citometria de Fluxo

Após 24 horas com os diferentes tratamentos, amostras (1×10^6 células/poço) foram retiradas dos poços por raspagem com auxílio de embolo de seringa e placa sobre gelo, centrifugadas a 500 g, por 10 min a 4 °C, lavadas por duas vezes com PBS gelado e bloqueadas com solução de PBS/BSA 1% gelado por 30 min antes da adição dos anticorpos primários.

Para análise da expressão de MT1-MMP foram utilizados anticorpos primários (item 4.2) revelados com sistema de amplificação com anticorpo biotilado e streptavidina PE-Cy5 (item 4.2). Todas as amostras foram incubadas com anticorpos a 4 °C por 1 hora, com duas lavagens com PBS/BSA 1% a cada intervalo.

Após marcação, células foram lavadas e fixadas em solução de paraformaldeído a 1%, mantidas ao abrigo da luz, seguida de análise imediata por citometria de fluxo (BD FACScalibur – *Fluorescence Activated Cell Sorter*), no Laboratório de Biologia do Reconhecer, da UENF. Foram analisados entre 10,000–15,000 eventos. Os histogramas foram obtidos utilizando WinMDI 2.8 *software*.

4.10 Análise da capacidade de adesão e transmigração de macrófagos *in vitro* (Transwell assay)

A infecção com *T. gondii* foi feita em tubos tipo Falcon de polipropileno (15 ml) na proporção de 3:1 (parasitos:célula), por um período de 1h a temperatura ambiente. Em seguida as células foram centrifugadas a 500 g por 10min e ressuspensas em RPMI com 2% de SFB. Para as amostras tratadas com os

inibidores de furina e γ -secretase, células após 1h de infecção foram ressuspensas com as concentrações de 2 μ M e 20 μ M respectivamente.

Na placa de 24 poços, as células foram distribuídas em insertos com membranas *transwell* com poros de 8,0 μ m (ThinCert™- PoreØ 8.0 μ m/ Greiner bio-one) cobertas com camada uniforme de Matrigel™ (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix). O preparo do Matrigel™ foi feito seguindo as recomendações do fabricante. Na parte inferior dos insertos foi adicionado meio RPMI contendo 20% de SFB, como um quimioatraente.

Para as amostras transfectadas com siRNAs para MT1-MMP e CD147, após 4 horas da adição das células nos insertos, foram feitos os procedimentos descritos no item 4.6.3. Após 24 horas de infecção, todas as amostras que receberam os diferentes tratamentos nos insertos, foram lavadas por três vezes com PBS para retirar as células que não transmigraram. Além disso, foi utilizado um *swab*, com cuidado para não soltar as células que estavam fortemente aderidas na membrana *transwell*. Na sequência, as membranas foram fixadas com paraformaldeído 2%.

Para a visualização por microscopia óptica, os insertos foram lavados com PBS e em seguida foi adicionada solução de cristal violeta a 0,5% por 15 minutos. Passado esse tempo, os insertos foram lavados com água corrente. Após a secagem dos insertos, à temperatura ambiente, as membranas *transwell* com Matrigel™ foram recortadas dos insertos com lâmina de bisturi, montadas sobre lâminas contendo glicerol e cobertas com lamínulas. A face da membrana que continha matigel™ foi fotografada em 03 campos aleatórios com a câmera AxioCam Mrc5 (Axiovision system - Zeiss) com objetiva de 40 x, em sistema AxioVision (Zeiss). As células transmigradas foram contadas em 5 imagens de 3 experimentos independentes. A média de células por tratamento e gráficos foram realizados utilizando GraphPad Prism 5.

4.11 Análise estatística

As análises foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Os valores estão expressos como média, desvio padrão (DP) ou números absolutos. Todos os dados foram analisados pelo Teste *t de student* não paramétrico bicaudal utilizando o *software* Prism. Os gráficos foram montados com intervalo de 5 a 95% de confiança e o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1 *T. gondii* aumenta a expressão de MT1-MMP, CD147 e ADAM10 em macrófagos.

A análise da expressão das proteínas de interesse em macrófagos da linhagem Raw 264.7 infectados por *T. gondii*, foi realizada por imunofluorescência para MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 e citometria de fluxo para MT1-MMP. Macrófagos Raw 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo da expressão destas moléculas.

O padrão de expressão das proteínas de interesse após 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de infecção foi avaliado de maneira qualitativa através das imagens obtidas por microscopia de fluorescência. O núcleo das células foi marcado por DAPI (azul) e as proteínas de interesse, analisadas individualmente, marcadas por Alexa Fluor 568 (vermelho). Além disso, para o experimento de cinética de expressão, os taquizoítos de *T. gondii* foram marcados por FITC (Verde). A fluorescência, por célula, das proteínas marcadas com Alexa Fluor 568 foi mensurada após tratamento das imagens no *software ImageJ* e cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF).

A expressão de MT1-MMP após 24 horas de infecção também foi quantificada por citometria de fluxo. O gráfico demonstra os parâmetros de intensidade de fluorescência vermelha, pela marcação de MT1-MMP por PE-Cy5 (FL4) e quantidade de células. Levando em consideração que o detector FSC correlaciona-se com o volume celular, e o SSC depende da complexidade interna da partícula como forma do núcleo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos, foi definida uma janela de análise sobre a região correspondente à subpopulação de interesse a fim de maximizar a seleção de células que tivessem sido infectadas pelo parasita (maior granulosidade).

Os resultados de cada uma das proteínas investigadas (MT1-MMP, ADAM-10 e CD147), obtidos após análises qualitativas e quantitativas do perfil de expressão nos macrófagos, são apresentados nos próximos tópicos. Nossos dados demonstram que a infecção por *T. gondii* aumenta a expressão de todas essas moléculas envolvidas na migração celular.

Através do ensaio de imunofluorescência, foi possível analisar a distribuição de MT1-MMP em macrófagos Raw 264.7 durante as primeiras 24 horas de infecção por *T. gondii*. Na figura 8 A é demonstrado, por imagens representativas, o aumento da expressão de MT1-MMP (vermelho) em macrófagos durante 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de infecção. E em contrapartida, o grupo controle não infectado, não apresenta expressão desta molécula em nenhum tempo avaliado. O aumento do número de parasitas (verde) por célula no decorrer da infecção, parece estar diretamente relacionado com o aumento da expressão desta metaloproteinase, visto que é observado sobreposição da marcação vermelha e verde (laranja).

Através da mensuração da fluorescência relativa, figura 8 B, observa-se que a expressão de MT1-MMP permanece constante nas primeiras 6 horas de infecção. No entanto, no período entre 6 a 12 horas de infecção é possível observar aumento significativo da expressão desta molécula. Entre 12 e 24 horas de infecção, a expressão de MT1-MMP é elevada, mas não sofre variação significativa.

Analisando a figura 8 A, pode-se observar que os taquizoítos de *T. gondii* foram marcados com o fluorocromo Alexa Flúor 568 (vermelho). Afim de confirmar a expressão desta proteína sobre o parasita, foi realizado um novo ensaio de microscopia de fluorescência no tempo de 24 horas de infecção sem a utilização do anticorpo específico para *T. gondii* e secundário conjugado a FITC. A figura 9, apresenta imagens obtidas de três ensaios independentes, e confirma a presença de MT1-MMP em taquizoítos de *T. gondii*, além disso essa metaloproteinase pode ser encontrada na membrana celular e difusa no

citoplasma ou condensada em regiões como a perinuclear nos macrófagos infectados.

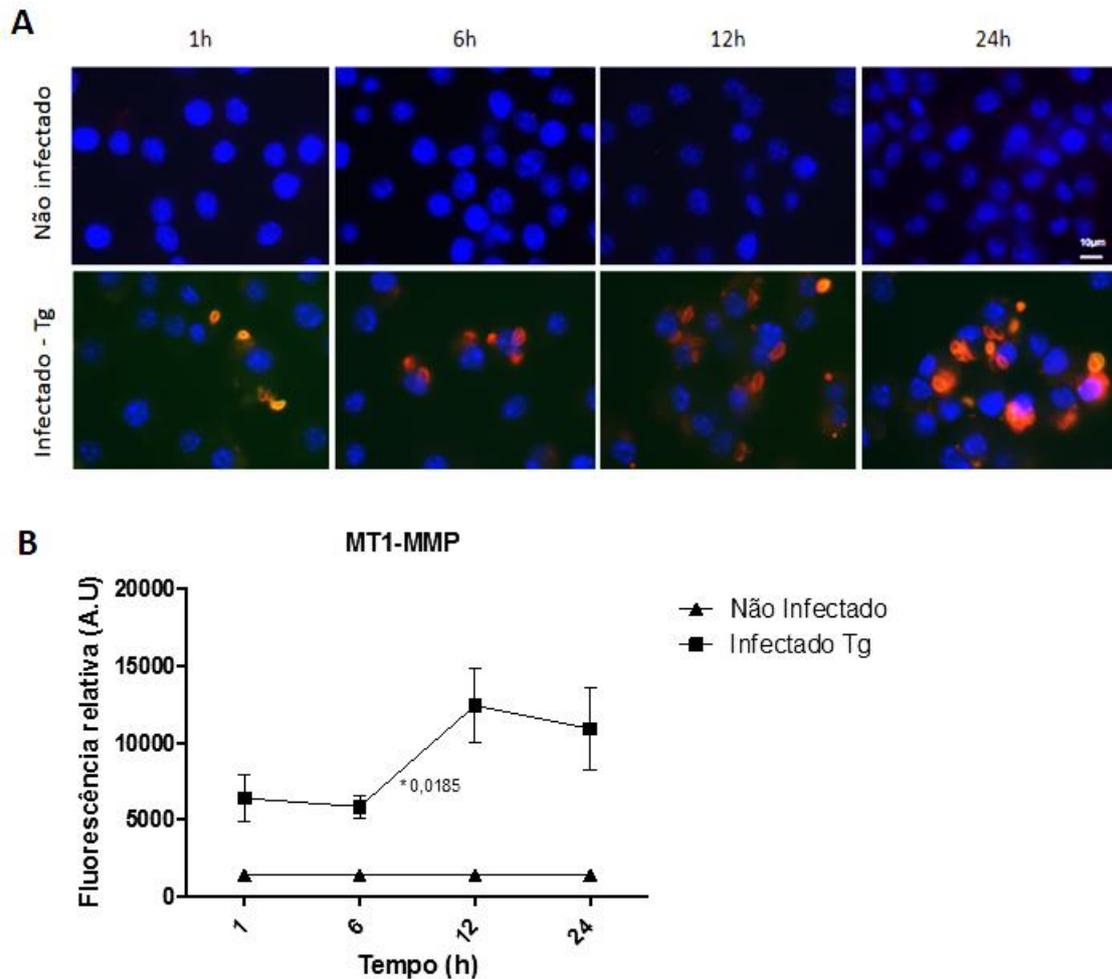


Figura 8. Expressão de MT1-MMP em macrófagos após 1 h, 6h, 12 h e 24 h de infecção por *T. gondii* (Tg). Macrófagos não infectados foram utilizados como controle. A) Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho), núcleo celular (DAPI - azul) e *T. gondii* (FITC - verde). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U) mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). O Teste *t de Student* foi aplicado para determinar a relevância estatística. Foi demonstrado um valor significativo (*)

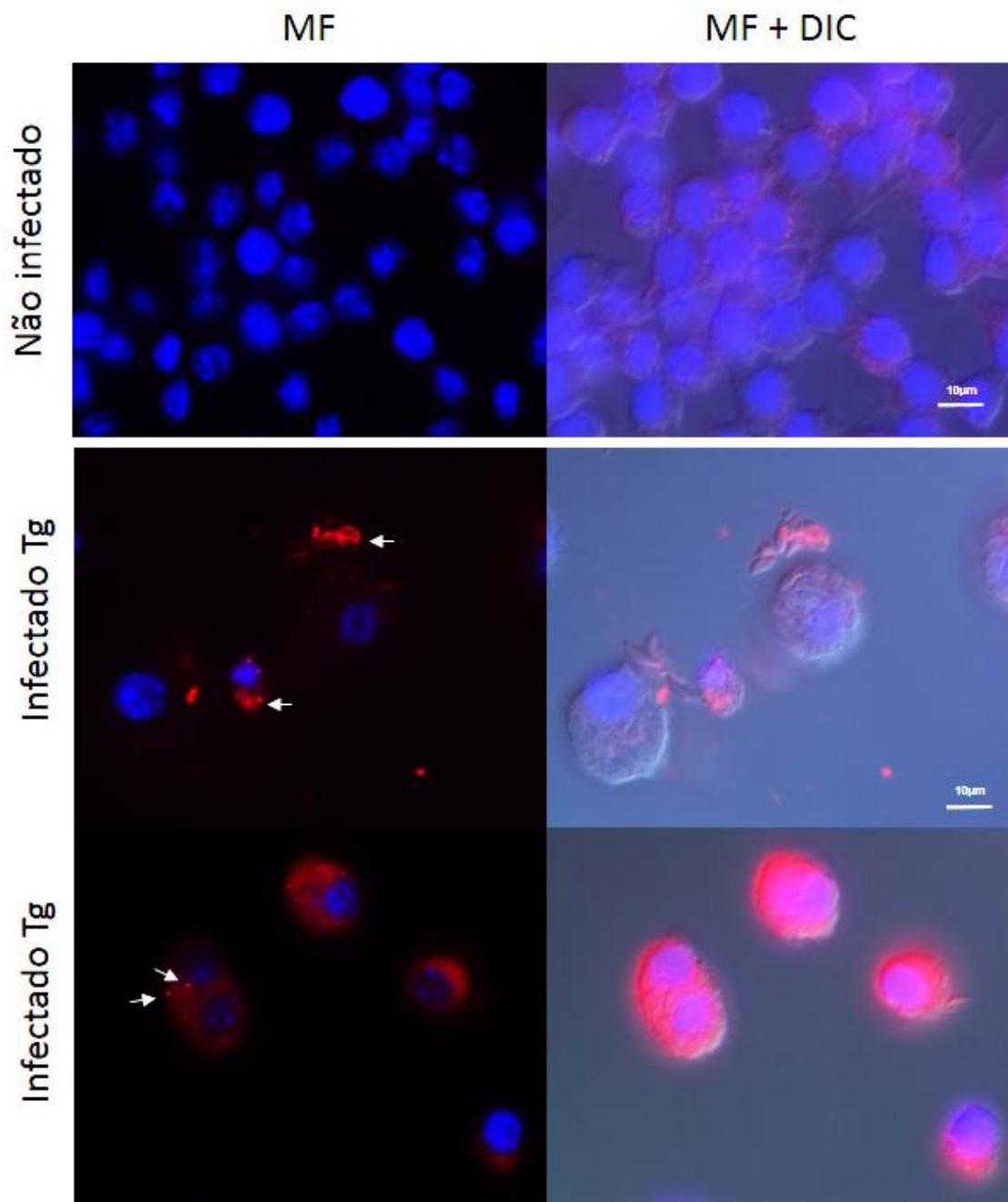


Figura 9. Aumento da expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 h de infecção por *T. gondii* (Tg). Macrófagos não infectados utilizados como controle. Microscopia de fluorescência, MT1-MMP (Alexa Fluor 568 - vermelho), núcleo celular (DAPI - azul). 100x. MF: Microscopia de fluorescência; DIC: Microscopia de Contraste Diferencial Interferencial (DIC). Setas indicam expressão de MT1-MMP

A citometria de fluxo, feita após 24 horas de infecção, corrobora com os resultados obtidos por microscopia de fluorescência, ao demonstrar que a maioria dos macrófagos infectados apresentam super-expressão de MT1-MMP quando comparados ao grupo controle não infectado por *T. gondii* (Figura 10).

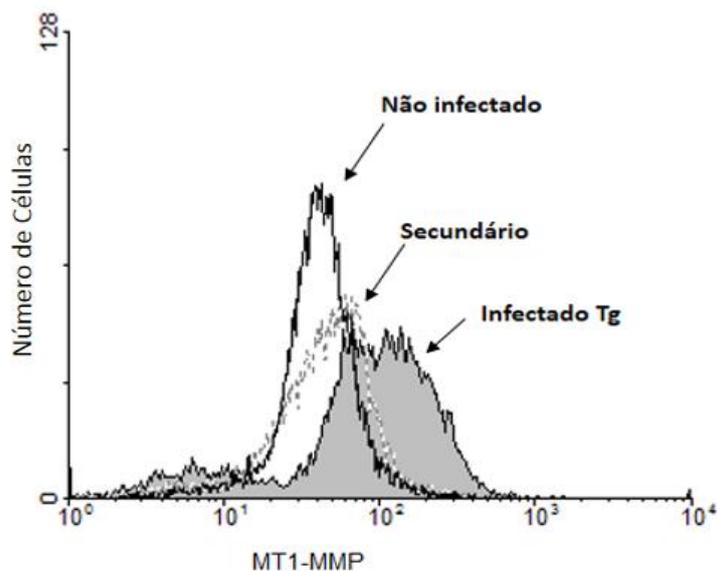


Figura 10. Citometria de fluxo para análise da expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por *T. gondii*. Análise da expressão realizada em células infectadas por *T. gondii* (3:1) comparadas ao controle não infectado. Relação entre a intensidade de fluorescência através da marcação de MT1-MMP com PE-CY5 (eixo X) e quantidade de células (eixo Y)

Seguindo a metodologia proposta, observou-se que a infecção por *T. gondii* também aumenta a expressão de ADAM-10 em macrófagos, durante 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de infecção, quando comparado ao controle não infectado (Figura 11 A). Entre 6 h e 24 h há aumento significativo da expressão desta molécula nas culturas infectadas (11 B). O aumento da expressão parece estar relacionado com o aumento do número de parasitas no decorrer do tempo da infecção, visto que é observado sobreposição dos corantes (laranja) (11 A).

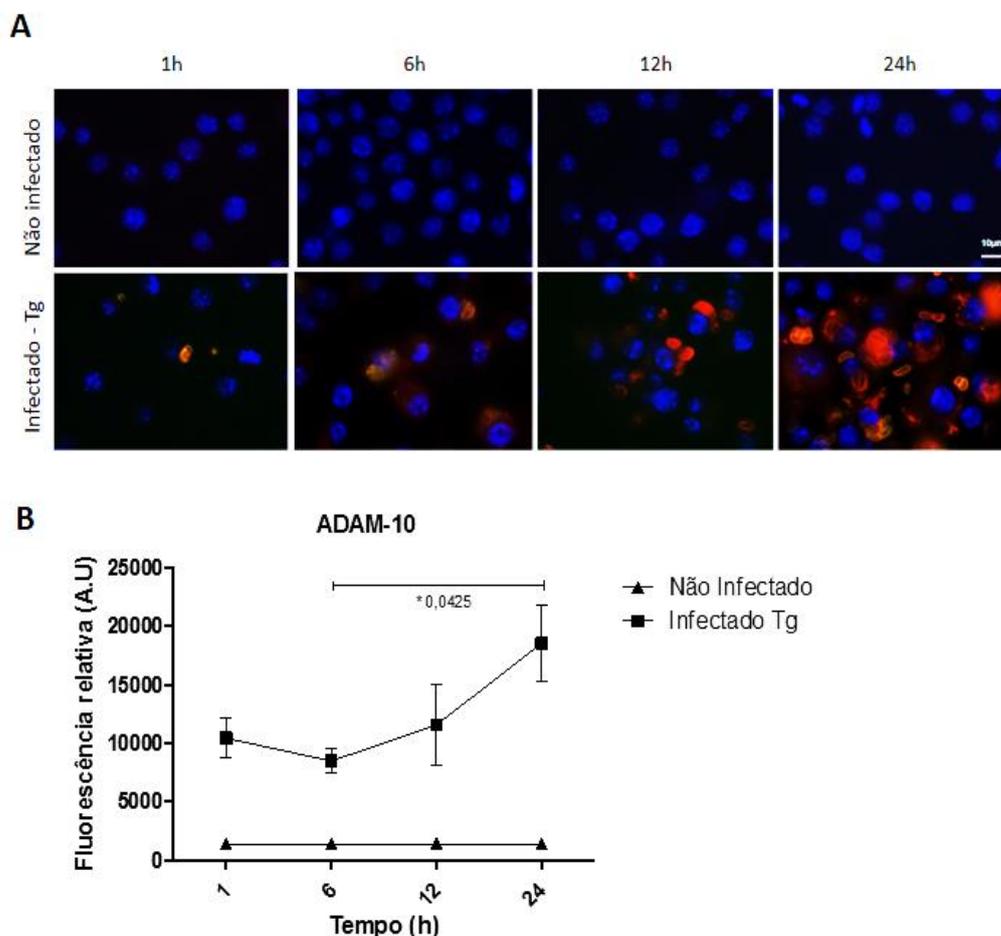


Figura 11. Expressão de ADAM-10 em macrófagos após 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de infecção por *T. gondii* (Tg). Macrófagos não infectados utilizados como controle. A) Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho), núcleo celular (DAPI - azul) e *T. gondii* (FITC - verde). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U) mensurada através do TCCF. O Teste *t de Student* foi aplicado para determinar a relevância estatística. Foi demonstrado um valor significativo (*)

Analisando a microscopia de fluorescência e a sobreposição destas imagens com DIC (figura 12), nota-se que ADAM-10 é super-expressa e

encontra-se em maior concentração na membrana plasmática dos macrófagos infectados. Também é possível observá-la difundida ou condensada no citoplasma destas células.

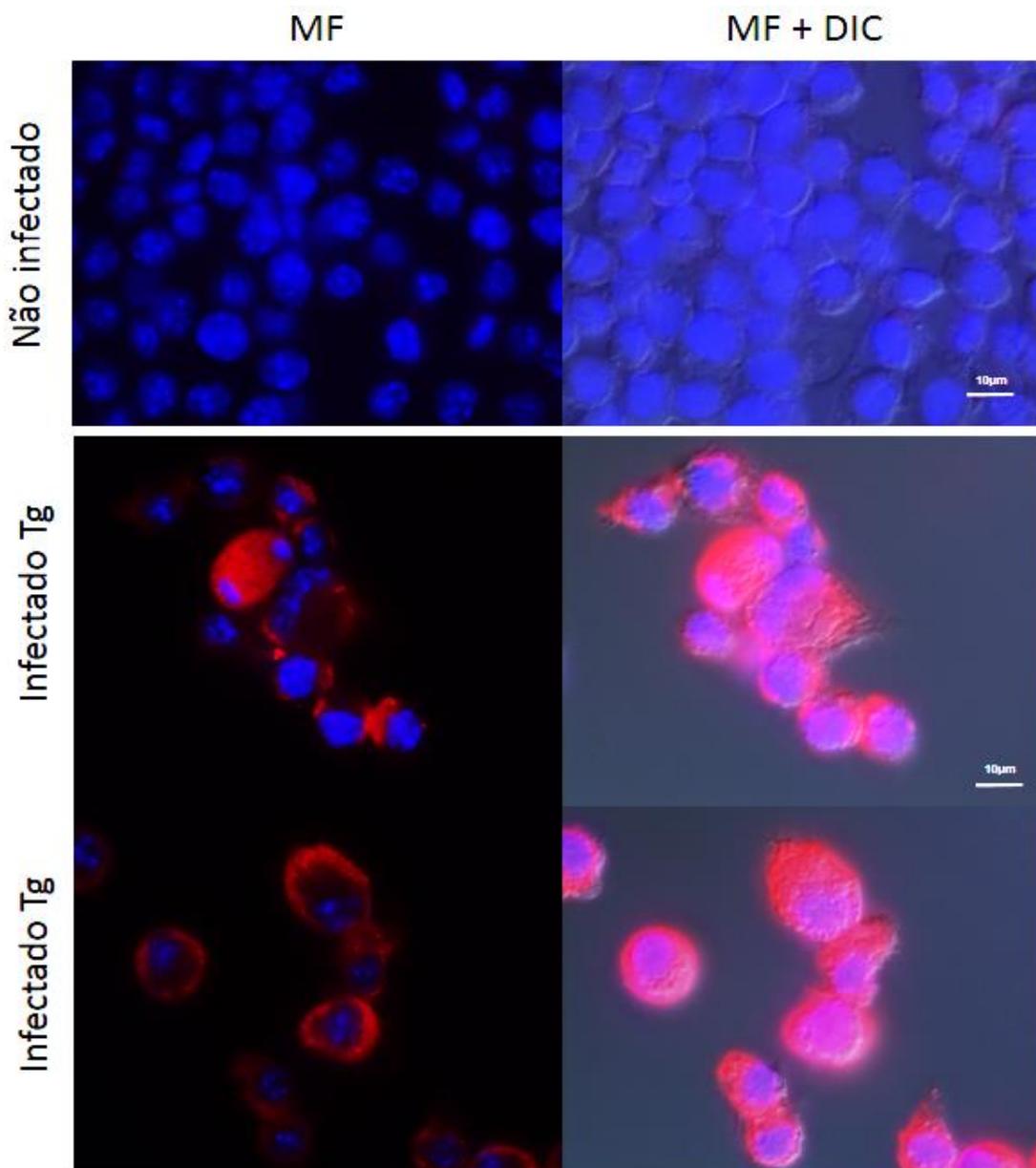


Figura 12. Aumento da expressão de ADAM-10 em macrófagos após 24 h de infecção por *T. gondii* (Tg). Macrófagos não infectados foram utilizados como controle. Microscopia de fluorescência, ADAM-10 (Alexa Fluor 568 - vermelho), núcleo celular (DAPI - azul). 100x. MF: Microscopia de fluorescência; DIC: Microscopia de Contraste Diferencial Interferencial (DIC)

Para verificar se a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir a expressão do indutor de metaloproteinases, CD147, em macrófagos murinos, foi realizada a marcação com Alexa flúor 568 a fim de demonstrar a possível expressão desta proteína nas primeiras 24 horas de infecção.

Como observado na figura 13, a expressão desta glicoproteína de membrana aumenta de maneira progressiva e proporcional ao tempo de infecção e quantidade de parasita por célula, diferente do controle que apresenta nível basal em todos os tempos avaliados. A análise estatística demonstra que a expressão aumenta de maneira significativa entre os tempos de 1 h e 24 h de infecção.

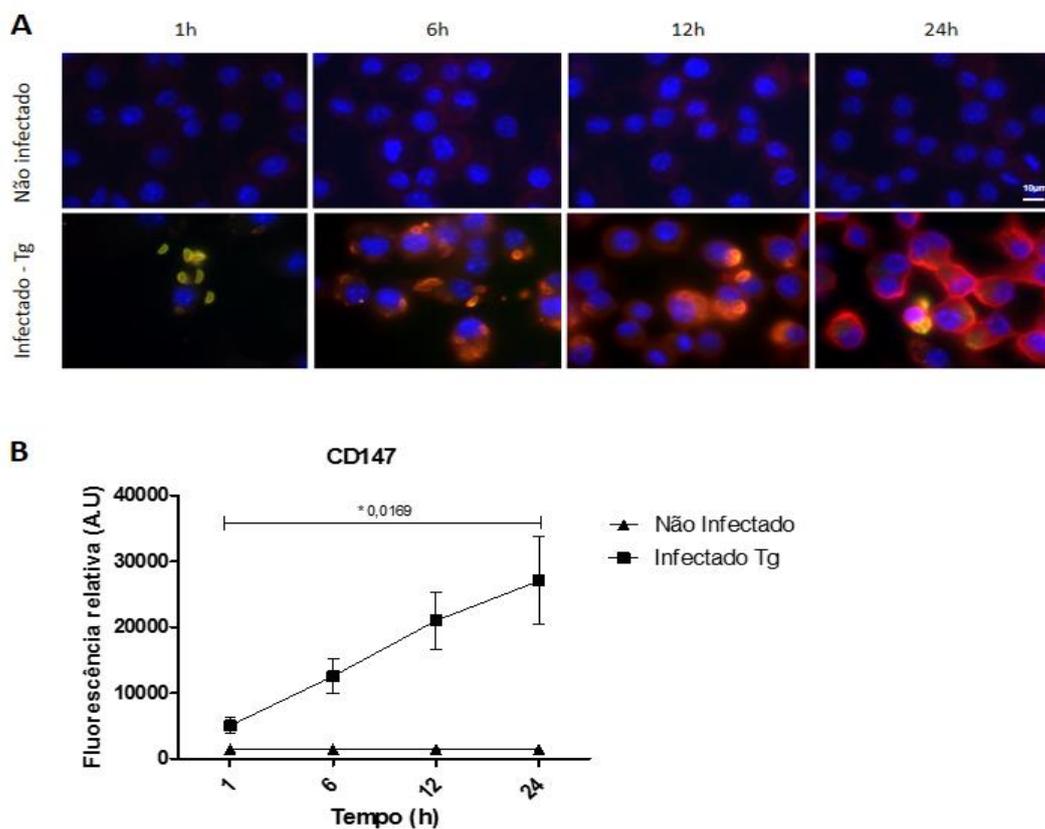


Figura 13. Expressão de CD147 em macrófagos após 1 h, 6h, 12 h e 24 h de infecção por *T. gondii* (Tg). Macrófagos não infectados foram utilizados como controle. A) Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho), núcleo celular (DAPI - azul) e *T. gondii* (FITC - verde). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U) mensurada por TCCF. O Teste *t de Student* foi aplicado para determinar a relevância estatística. Foi demonstrado um valor significativo (*)

A análise das imagens de fluorescência, com dupla marcação (vermelho e azul) e sobreposição com DIC, demonstram que CD147 é fortemente expressa nas áreas marginais dos macrófagos infectados. Também é possível observar regiões da membrana com maior concentração desta molécula (figura 14).

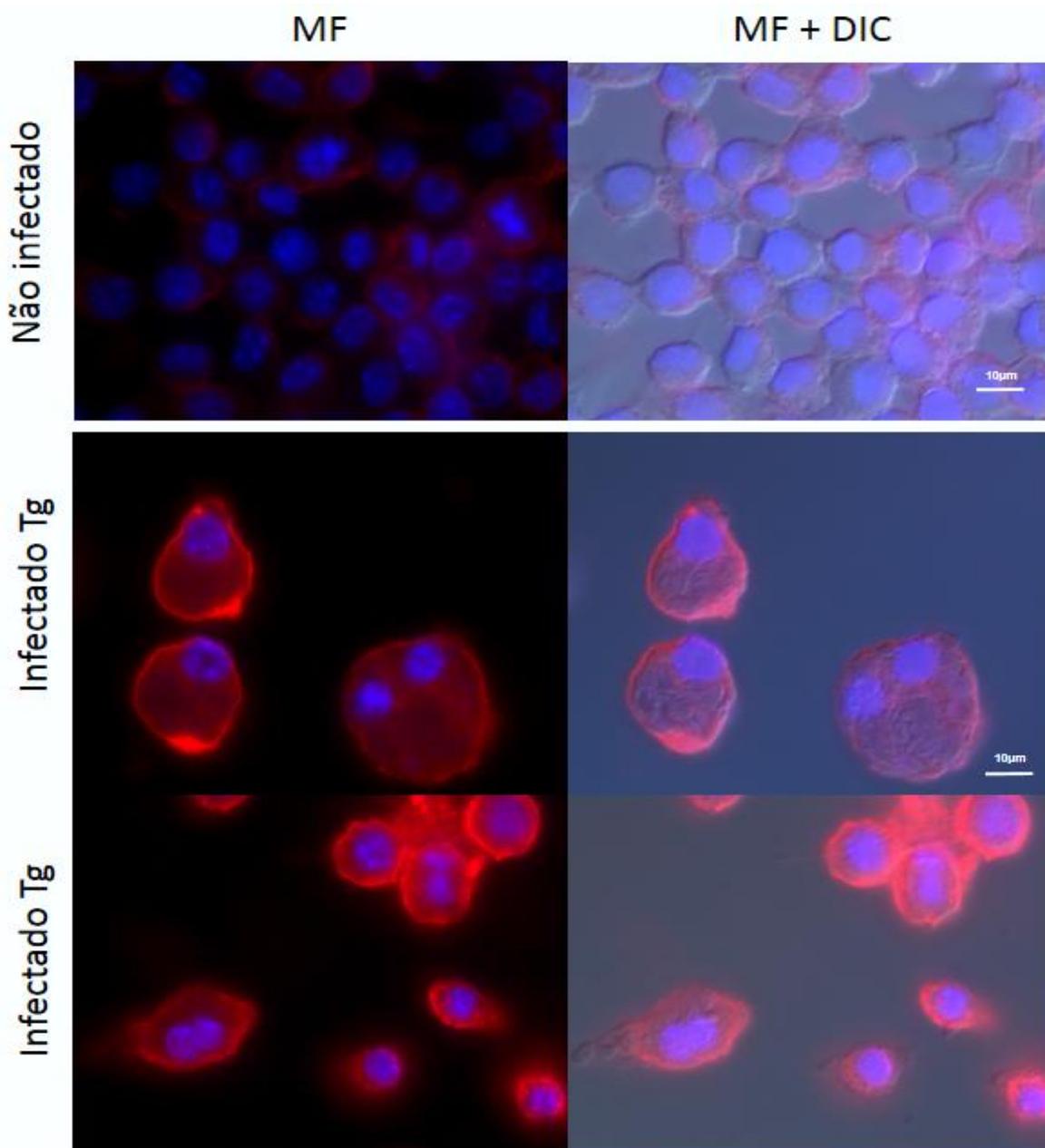


Figura 14. Aumento da expressão de CD147 em macrófagos Raw 264.7 após 24 h de infecção por *T. gondii* (Tg). Macrófagos não infectados utilizados como controle. Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho), núcleo celular (DAPI - azul). 100x. MF: Microscopia de fluorescência; DIC: Microscopia de Contraste Diferencial Interferencial (DIC)

5.2 Efeito dos inibidores de furina convertase e γ -secretase nos macrófagos infectados por *T. gondii*.

A síntese de metaloproteinases inativas, na forma de zimogênios, permite que a atividade proteolítica das células seja regulada, prevenindo a degradação de substratos de maneira inadequada. Para analisar as possíveis vias de regulação/processamento envolvidas na ativação dos zimogênios de MT1-MMP e ADAM-10 em macrófagos infectados, e na expressão de CD147, que não possui atividade enzimática, foram utilizados inibidores de furina e γ -secretase.

Inicialmente, a concentração dos inibidores foram selecionadas através do teste de viabilidade, MTT. O teste MTT funciona como um indicador de sobrevivência e / ou crescimento celular, ele determina a presença de células vivas com mitocôndrias funcionais e pode ser utilizado para detectar citotoxicidade e crescimento celular. Através deste ensaio, foi avaliado o efeito de três concentrações do inibidor de furina ou duas do inibidor de γ -secretase em macrófagos infectados ou não infectados por *T. gondii*.

Como observado na figura 15, o inibidor de furina, nas concentrações de 1 μ M e 2 μ M, não interferiu na viabilidade dos macrófagos Raw 254.7 após 24 horas de tratamento. No entanto, na maior concentração testada, reduziu em aproximadamente 35 % a viabilidade celular tanto em macrófagos não infectados quanto em macrófagos infectados por *T. gondii*. O inibidor de γ -secretase apresentou efeito similar sobre macrófagos infectados e não infectados, não interferindo, de maneira significativa, na viabilidade das células nas concentrações testadas (Figura 16).

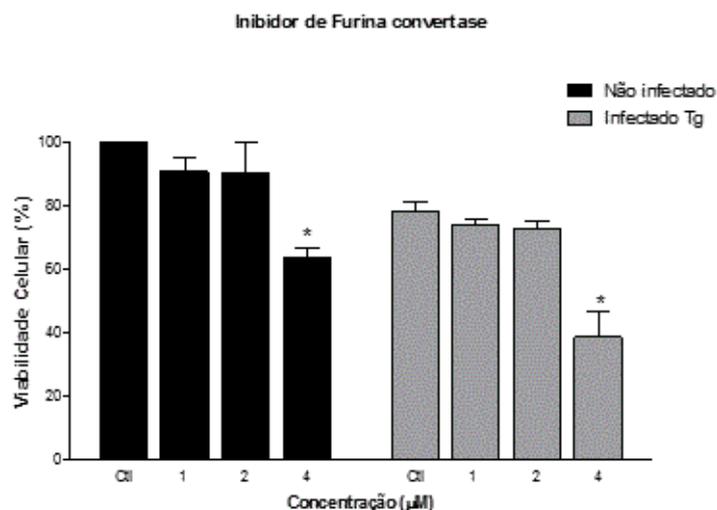


Figura 15. Efeito do inibidor de furina convertase na viabilidade de macrófagos não infectados e infectados por *T. gondii*. Avaliação da viabilidade pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento (n=3). Inibidor adicionado 1 hora após infecção. Meio RPMI utilizado como controle

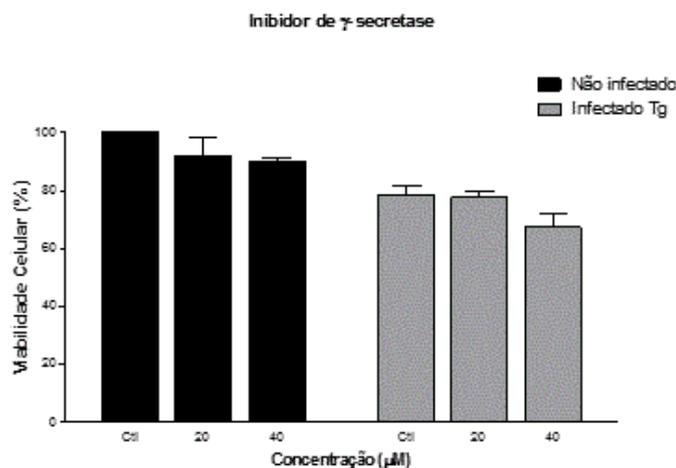


Figura 16. Efeito do inibidor de γ -secretase na viabilidade de macrófagos não infectados e infectados por *T. gondii*. Avaliação da viabilidade pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento (n=3). Inibidor adicionado 1 hora após infecção. Meio RPMI utilizado como controle

A partir da avaliação da viabilidade dos macrófagos infectados por *T. gondii* frente as diferentes concentrações dos inibidores, foi possível escolher as concentrações que foram utilizadas nos ensaios subsequentes. Analisando os gráficos de viabilidade foram escolhidas as concentrações de 2 μ M e 20 μ M para furina e γ -secretase, respectivamente.

5.2.1 Efeito dos inibidores de furina convertase e γ -Secretase no processamento de MT1-MMP, ADAM-10 e na expressão de CD147.

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos por microscopia de fluorescência. As imagens obtidas e o teste estatístico feito através da mensuração da fluorescência relativa permitem analisar o efeito dos inibidores de furina convertase e γ -secretase sobre o perfil de expressão de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 na superfície de macrófagos após 24 h de infecção por *T. gondii*.

5.2.1.1 Furina convertase pode participar do processamento de MT1-MMP em macrófagos infectados por *T. gondii*

A figura 17 A, demonstra o perfil de expressão de MT1-MMP em macrófagos infectados após tratamento com inibidor de furina através de imagens obtidas por microscopia de fluorescência utilizando anticorpo primário específico para a proteína de interesse e secundário conjugado a Alexa Fluor 568 (Vermelho). Nela é possível observar que o tratamento com inibidor de furina reduz a expressão de MT1-MMP na superfície dos macrófagos infectados por *T. gondii*, de maneira significativa como demonstrado na figura 17 B. Este resultado sugere que o processamento de MT1-MMP em macrófagos infectados por *T. gondii* é dependente da ativação por furina-convertase, com perfil de processamento similar ao demonstrado na literatura para células metastáticas com alta expressão desta molécula.

Diferente do efeito observado para expressão de MT1-MMP, o inibidor de furina é capaz de aumentar de maneira significativa a expressão de ADAM-10 na membrana plasmática das células infectadas após 24 horas de tratamento (Figura 18). A regulação positiva após inibição da sinalização por furina pode ser um indicativo da participação de MT1-MMP na regulação da expressão desta molécula.

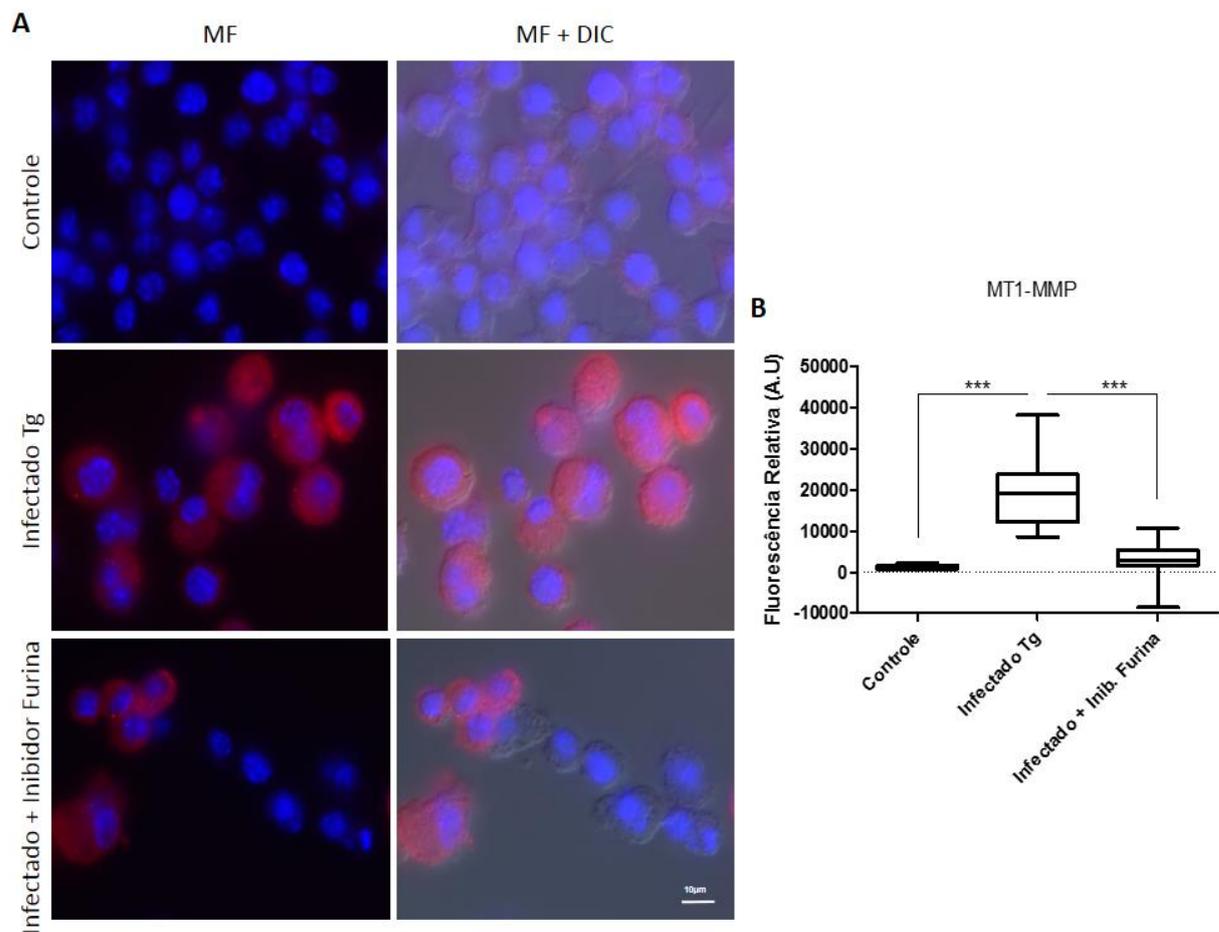


Figura 17. Expressão de MT1-MMP em macrófagos infectados por *T. gondii* (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de furina convertase ($2 \mu\text{M}$). Macrófagos infectados utilizados como controle positivo da expressão e macrófagos não infectados e tratados como controle negativo. A) Microscopia de fluorescência, MT1-MMP (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste *t de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

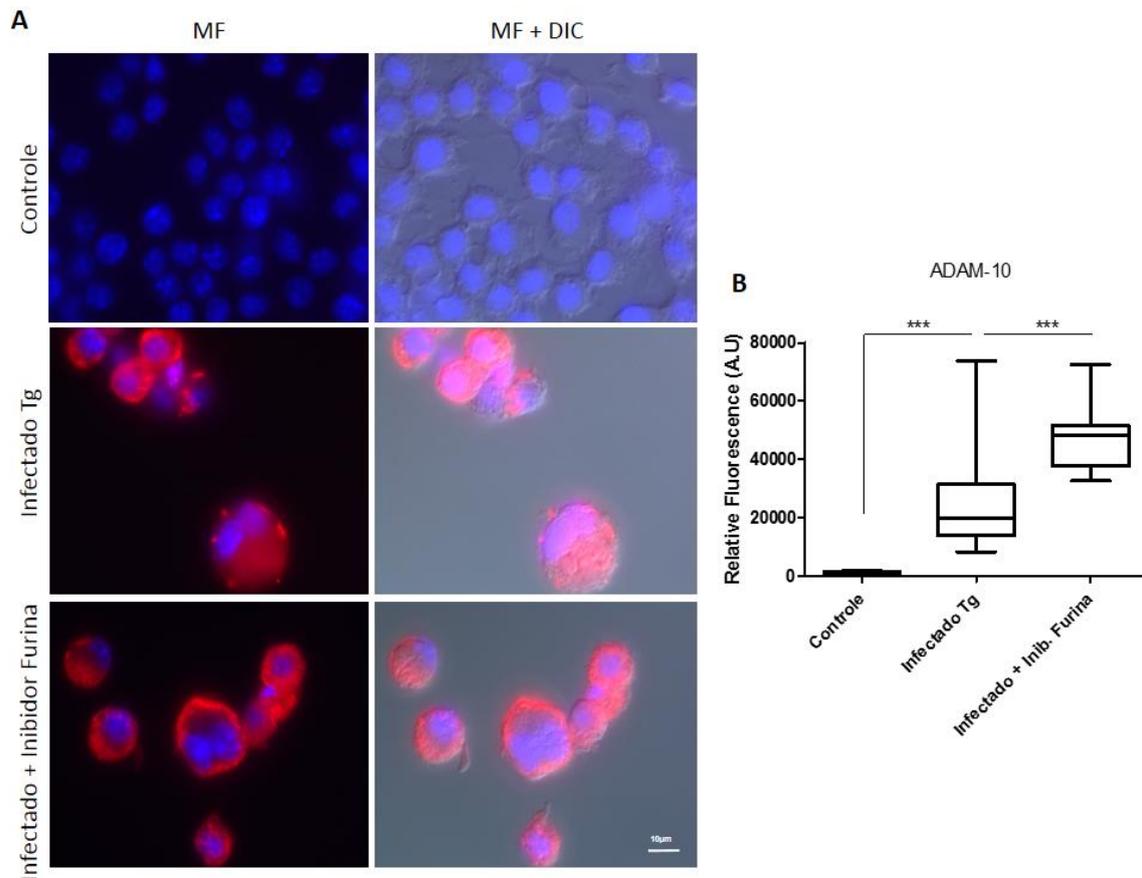


Figura 18. Expressão de ADAM-10 em macrófagos infectados por *T. gondii* (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de furina convertase, (2 μ M). Macrófagos infectados utilizados como controle positivo da expressão e macrófagos não infectados e tratados como controle negativo. A) Microscopia de fluorescência, ADAM-10 (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste t *de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

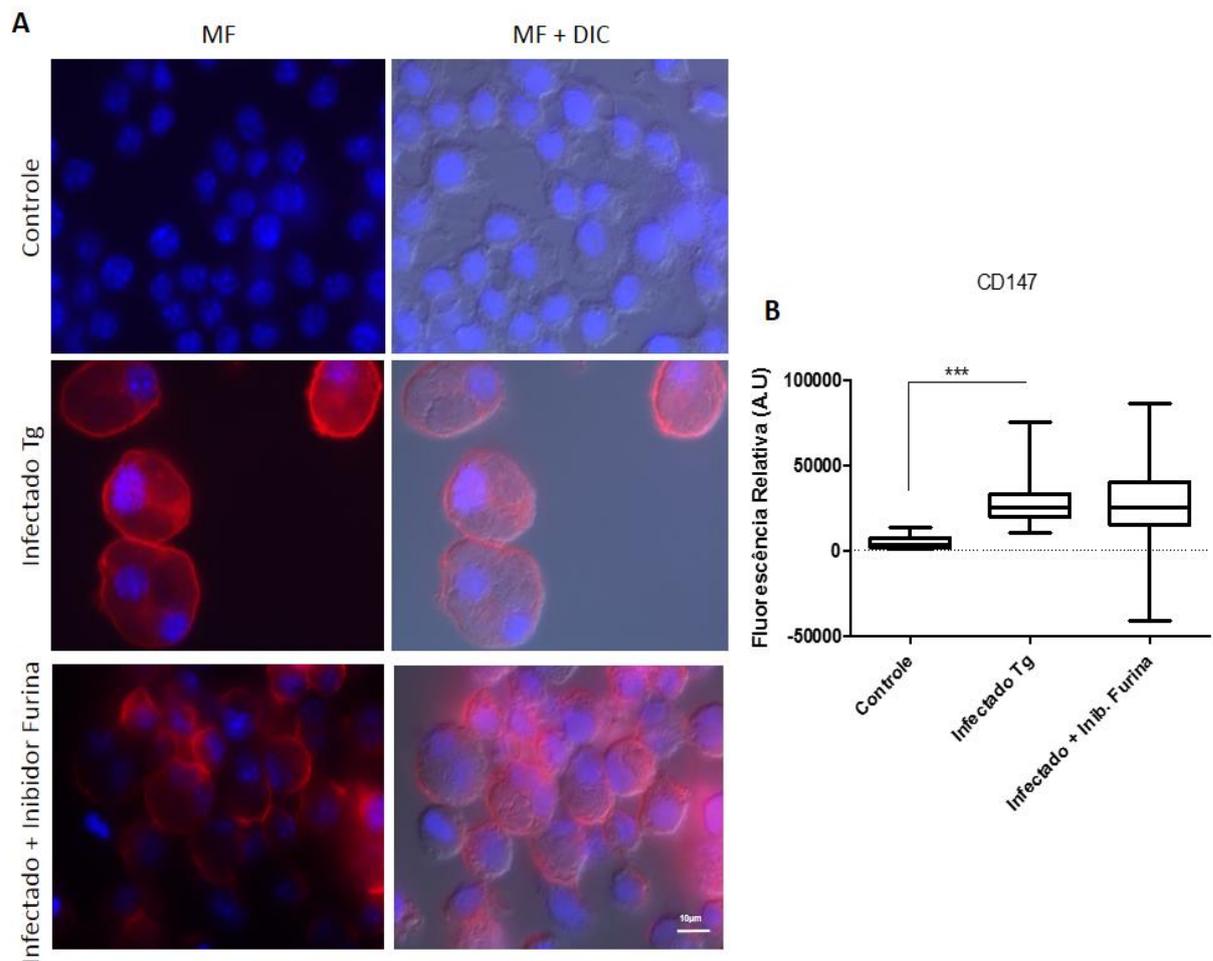


Figura 19. Expressão de CD147 em macrófagos infectados por *T. gondii* (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de furina convertase, (2 μ M). Macrófagos infectados utilizados como controle positivo da expressão e macrófagos não infectados e tratados como controle negativo. A) Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste *t de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

5.2.1.2. γ -Secretase pode participar do processamento de ADAM-10 em macrófagos infectados por *T. gondii*

Ao utilizar o inibidor de γ -secretase, indiretamente pretende-se inibir a via de sinalização Notch. Esta via pode ser regulada por ADAM-10, visto que Notch é um substrato desta molécula. Ao clivar o ectodomínio de Notch através do complexo γ -secretase, ADAM10 promove à liberação de um fragmento extracelular solúvel e um domínio intracelular citosólico que será responsável por toda sinalização intracelular Notch.

Através da microscopia de fluorescência para análise da expressão de ADAM-10, foi demonstrado que o complexo γ -secretase pode estar envolvido na atividade desta metaloproteinase super-expressa em macrófagos infectados por 24 horas com *T. gondii*. O inibidor DAPT, específico para γ -secretase foi capaz de reduzir significativamente a expressão de ADAM-10 na superfície dos macrófagos infectados quando comparados aos macrófagos infectados que não receberam este tratamento (Figura 20). Em contrapartida, este inibidor não foi capaz de interferir na expressão de MT1-MMP ou de CD147 (Figura 21 e 22) na concentração testada, sugerindo que estas moléculas possam se tornar ativas independente do complexo γ -secretase.

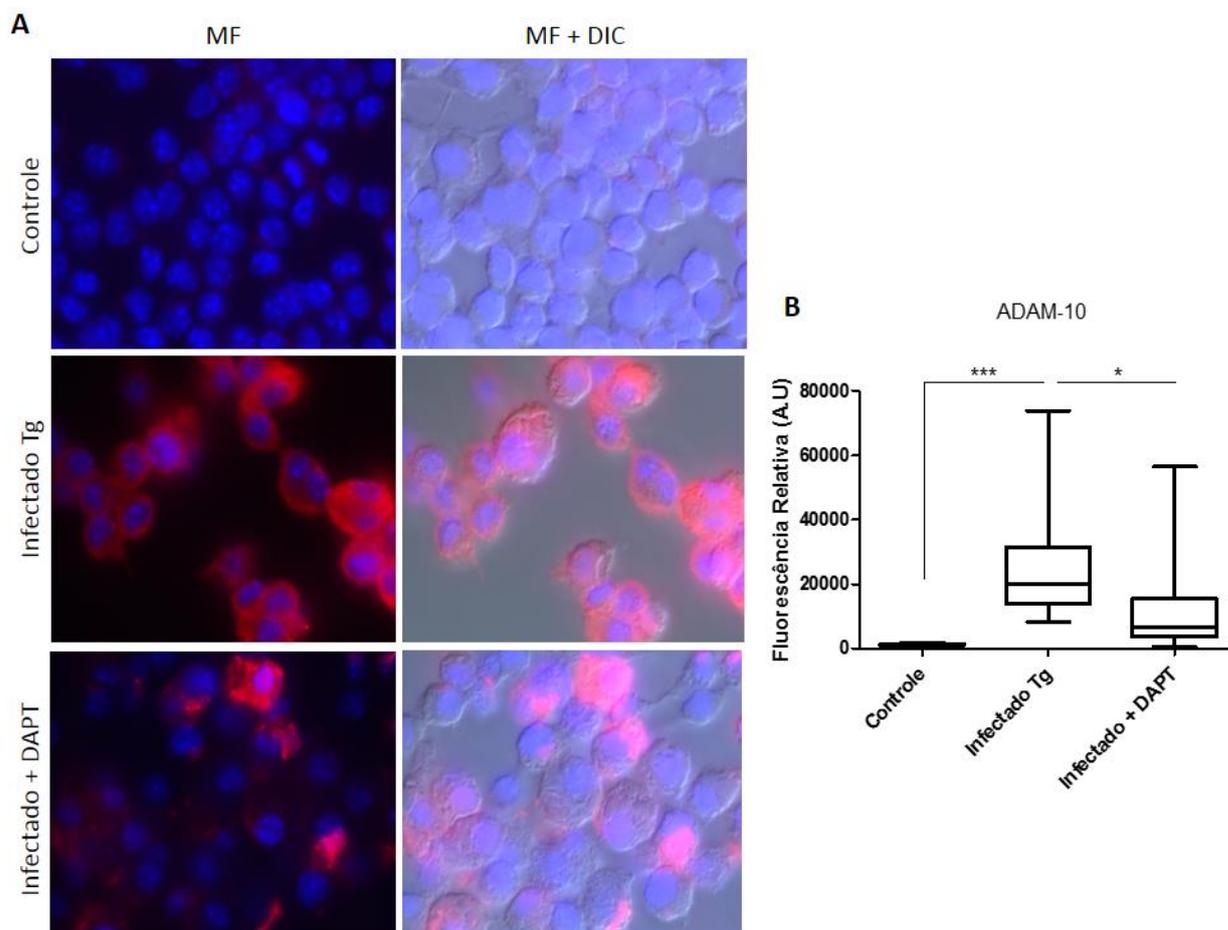


Figura 20. Expressão de ADAM-10 em macrófagos infectados por *T. gondii* (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de γ -secretase (DAPT – 20 μ M). Macrófagos infectados utilizados como controle positivo da expressão e macrófagos não infectados e tratados como controle negativo. A) Microscopia de fluorescência, ADAM-10 (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste t *de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

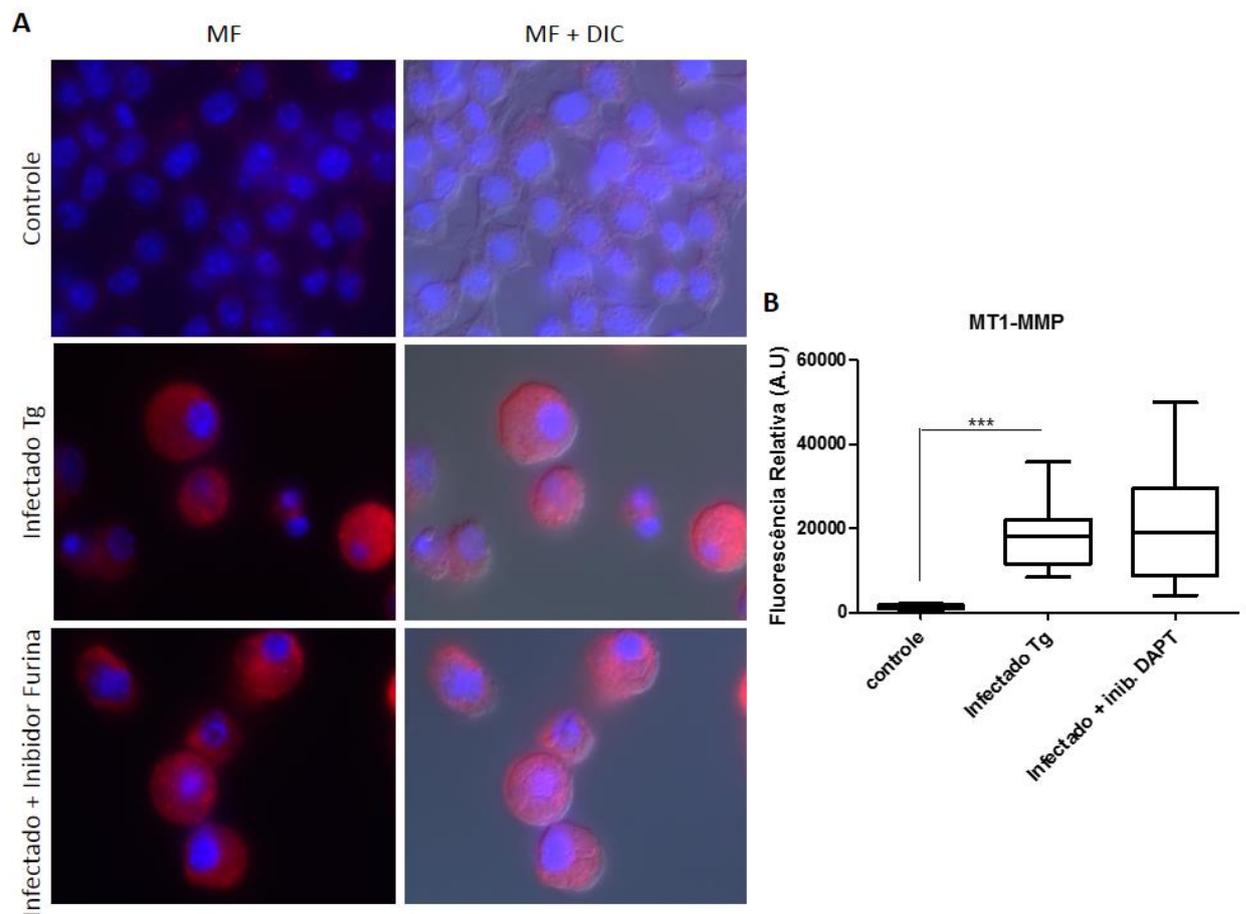


Figura 21. Expressão de MT1-MMP em macrófagos infectados por *T. gondii* (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de γ -secretase (DAPT – 20 μ M). Macrófagos infectados utilizados como controle positivo da expressão e macrófagos não infectados e tratados como controle negativo. A) Microscopia de fluorescência, MT1-MMP (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste *t de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

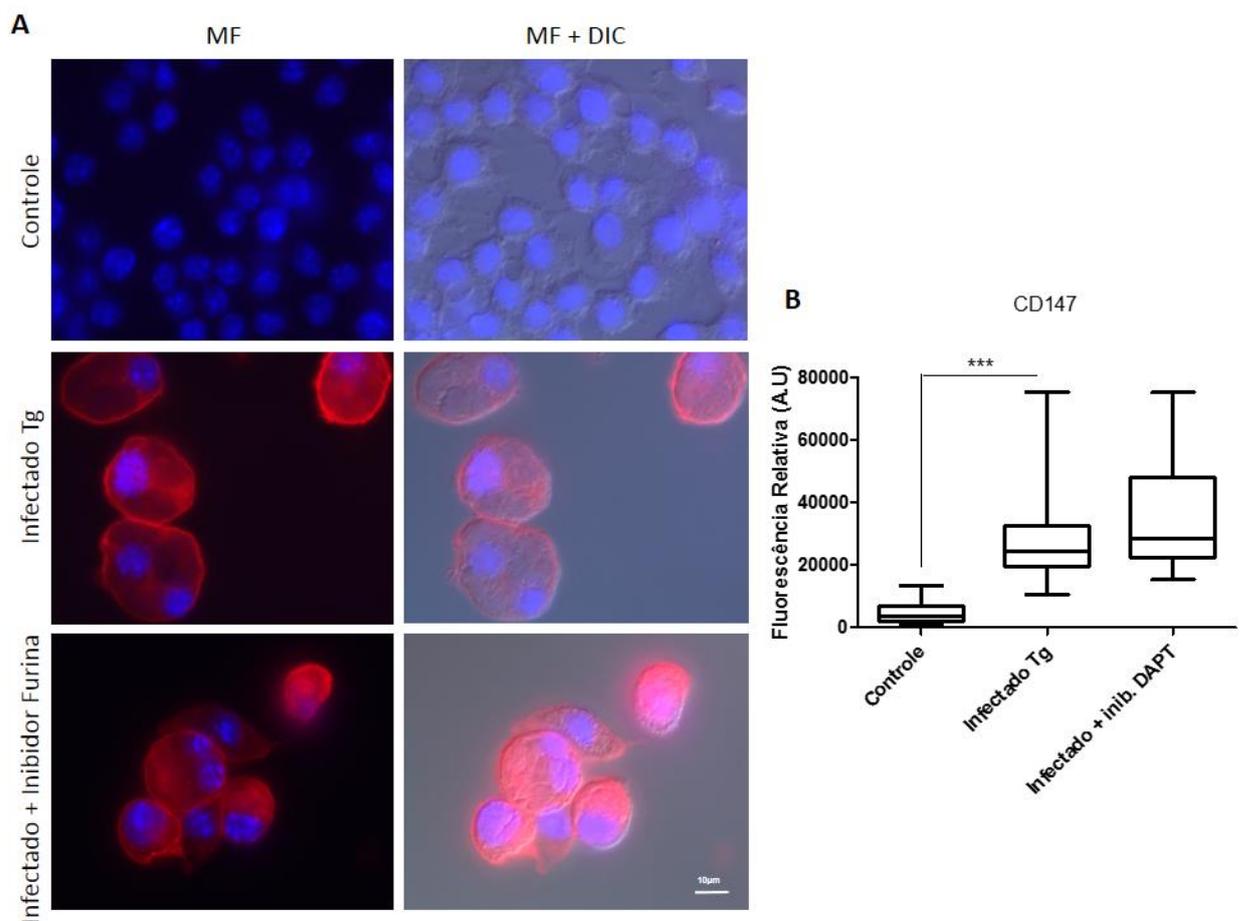


Figura 22. Expressão de CD147 em macrófagos infectados por *T. gondii* (Tg) após 24 horas de tratamento com inibidor de γ -secretase (DAPT – 20 μ M). Macrófagos infectados utilizados como controle positivo da expressão e macrófagos não infectados e tratados como controle negativo. A) Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste t *de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

5.2.2 Furina convertase e γ -Secretase são necessárias para promover a invasão/migração de macrófagos infectados por *T. gondii* em matriz extracelular tridimensional

Pesquisas prévias mostram que as vias de furina e γ -secretase estão envolvidas na invasão tumoral e metástase. Para investigar o efeito da inibição de furina e γ -secretase na migração e invasão de células Raw 264.7 infectadas por 24 h com *T. gondii*, foi realizado o ensaio de migração em sistema *transwell* para avaliar a invasividade destas células sobre uma matriz tridimensional que mimetiza a membrana basal (Matrigel™) e a influência das metaloproteínases expressas / secretadas por estas células neste mecanismo.

As células Raw 264.7 infectadas por *T. gondii* e tratadas com os inibidores de furina e γ -secretase 1 hora após a infecção, mostraram capacidade de invasão significativamente menor em comparação com as células infectadas sem o tratamento (Figura 23 B). As imagens representativas obtidas por microscopia óptica demonstram uma redução acentuada na quantidade de células infectadas aderidas a matriz 3D após tratamento com os inibidores (Figura 23 A). Os controles com células não infectadas não apresentaram capacidade de invasão e alteração no padrão de migração após 24 horas.

Esses dados indicam que os inibidores de furina e γ -secretase podem inibir significativamente a migração *in vitro* e a invasão de células Raw 264.7 infectadas por *T. gondii*, sugerindo a participação de metaloproteínases expressas e secretadas neste processo.

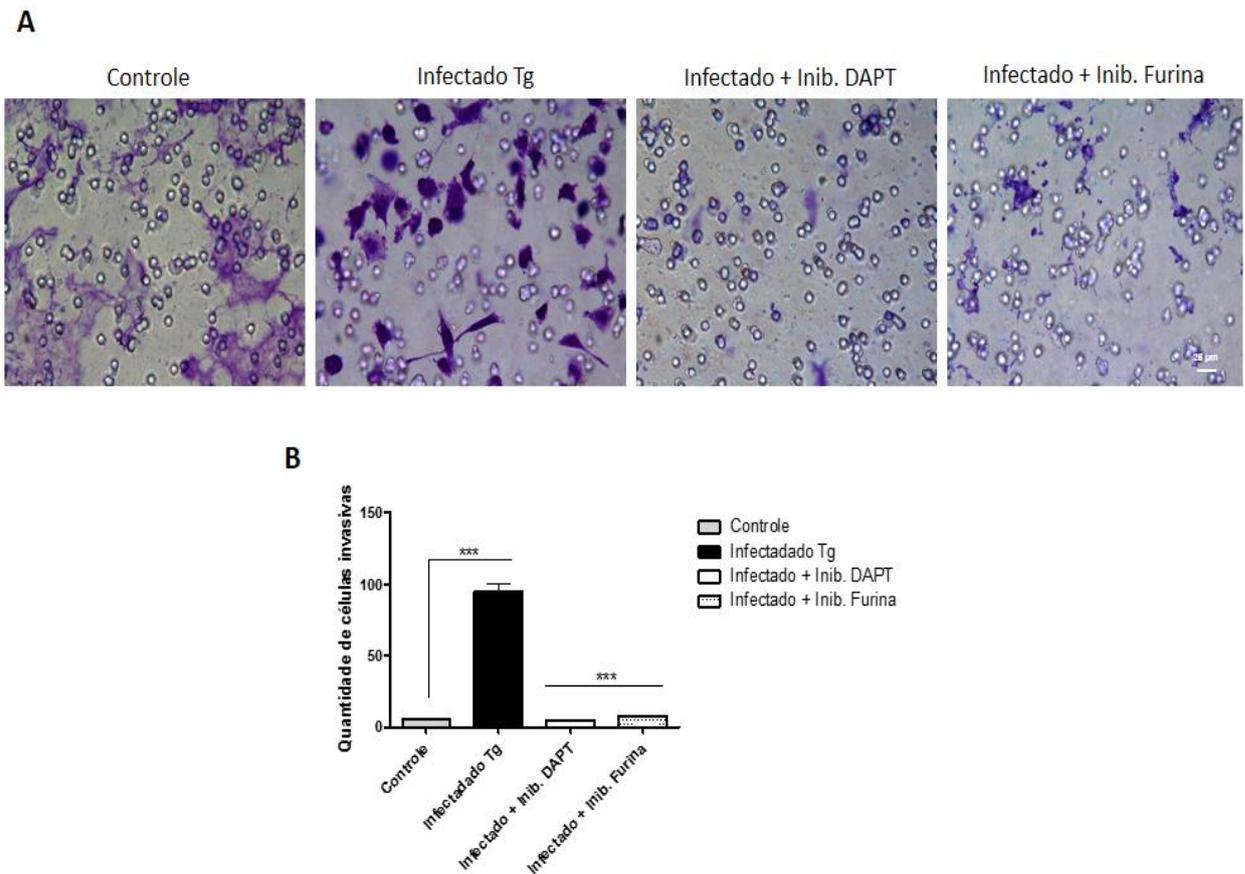


Figura 23. Efeito dos inibidores de furina e γ -secretase (DAPT) sobre a invasão de macrófagos infectados por *T. gondii*, utilizando matriz 3D (Transwell assay). Macrófagos tratados com inibidor DAPT ou Furina por 24 horas. Células não infectadas utilizadas como controle. A) Células invasivas coradas com cristal violeta (roxo) e imagens obtidas por microscopia óptica de campo claro. Foi utilizada objetiva de 40x B) Análise estatística após quantificação das células invasivas a partir de 3 imagens independentes ($n = 3$). Objetiva de 20x. Foi realizado Teste *T de Student* não paramétrico bicaudal para determinar a relevância estatística

5.3 Silenciamento gênico de MT1-MMP e CD147 por siRNA em macrófagos murinos infectados por *T gondii*.

A seguir, serão apresentados os resultados da padronização da transfecção de siRNAs, bem como a eficiência dos siRNAs específicos para MT1-MMP e CD147 em reduzir a expressão destas moléculas, em macrófagos Raw 264.7 infectados por *T. gondii*.

5.3.1 Padronização *in vitro* da transfecção de siRNA em macrófagos infectados por *T gondii*.

O RNA de interferência (RNAi) emergiu como um poderoso método para modular a expressão gênica/proteica. Desde o primeiro relato em 1998 (MEISTER et al., 2004), essa metodologia se expandiu para todos os campos da biologia, e é amplamente utilizada em estudos para rastreamento da funcionalidade de genes (GONCZY et al., 2000).

Neste trabalho foi utilizado uma combinação de três siRNAs de interferência de 19 a 25 nucleotídeos específicos para silenciar a expressão gênica de MT1-MMP ou de CD147 em macrófagos murinos infectados por *T. gondii* (RH). Os siRNAs, correspondem às fitas sense e antisense do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo chamado RISC (RNA *Interference Specificity Complex*). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita antisense guie o complexo até o mRNA (RNA mensageiro) alvo. Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva e degrada o mRNA (WITTRUP e LIEBERMAN, 2015).

O processo de entrada de ácidos nucleicos através da membrana celular do hospedeiro, chama-se transfecção (ZHANG et al., 2009). Para que a transfecção dos siRNAs seja eficiente, é necessária utilização de componentes lipídicos (PAUL et al., 2002). Estes são fundamentais para o sucesso da transfecção pois contêm subunidades lipídicas que formam lipossomos que interagem com siRNAs negativamente carregados impedindo a repulsão eletrostática na

membrana celular, o que facilita o acesso do siRNA ao interior da célula (BARBOSA e LIN, 2004).

Como fagócitos profissionais, macrófagos são dotados de enzimas que podem perturbar a integridade do ácido nucleico e fazer a transfecção de genes nessas células ineficiente. Isso é especialmente verdadeiro nos macrófagos ativados que sofrem maturação após exposição a estímulos imunitários ou inflamatórios (ZHANG et al., 2009). Por este motivo, linhagens como a Raw 264.7 são em particular muito difíceis de transfectar (CARRALOT et al., 2009).

Tendo como base o protocolo de transfecção, disponibilizado pela *Santa Cruz Biothecnology* e o trabalho desenvolvido por Carralot e colaboradores (2009) que fizeram um estudo de procedimentos para otimizar a transfecção em macrófagos Raw 264.7, foi desenvolvido um protocolo de silenciamento para a linhagem de macrófago Raw 264.7 infectadas por *T. gondii* utilizando siRNA conjugado a FITC não específico (controle), a fim de determinar qual seria a concentração de siRNA e de reagente lipídico necessários para uma transfecção mais eficiente.

Iniciamente, a fim de verificar qual seria a concentração de siRNA eficiente para transfecção, foram utilizadas concentrações do controle siRNA (conjugado a FITC): 0.2 μM ou 0.4 μM ou 0.8 μM e 0.4 μM ou 0.8 μM do reagente lipídico em células Raw 264.7 não infectadas. A microscopia de fluorescência foi realizada após 4h de transfecção (Figura 24). Na figura 25 é demonstrada a combinação com maior eficiência de transfecção: 0.8 μM de siRNA e 0.4 μM de reagente lipídico quando comparada ao controle não transfectado. A seleção das concentrações teve como parâmetro a intensidade da fluorescência das imagens nos tratamentos do experimento anterior e a viabilidade das células após 24 horas de transfecção.

Para verificar se a eficiência de transfecção era a mesma em macrófagos infectados por *T. gondii*, o mesmo protocolo foi realizado após 8h de infecção utilizando a proporção de 3 parasitas por célula (3:1). A eficiência da transfecção é demonstrada por imagens representativas obtidas por microscopia na figura 26 e demonstra que após 4h de transfecção há presença de siRNA no interior das células.

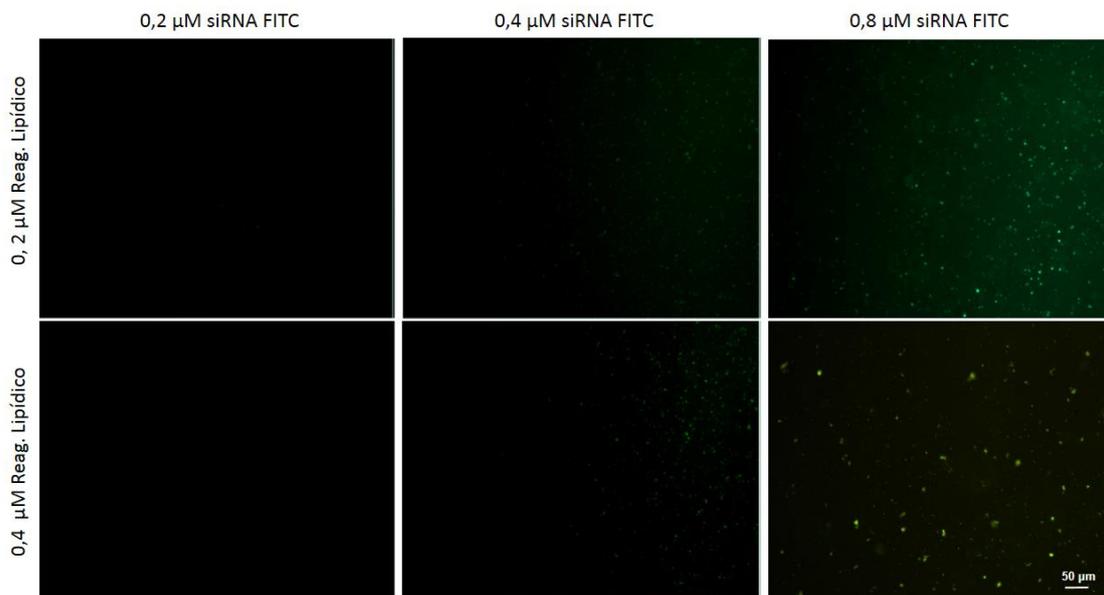


Figura 24. Células Raw 264.7 transfetadas com diferentes concentrações de siRNA-A e reagente lipídico. Macrófagos transfetados com as concentrações de 0,2 μM ou 0,4 μM ou 0,8 μM de siRNA-A e 0,4 μM ou 0,8 μM de reagente de transfecção (lipídico). Imagens foram obtidas através de câmera AxioCam utilizando o microscópio invertido Zeiss Axiovision, após 4 horas de transfecção. Objetiva de 20x

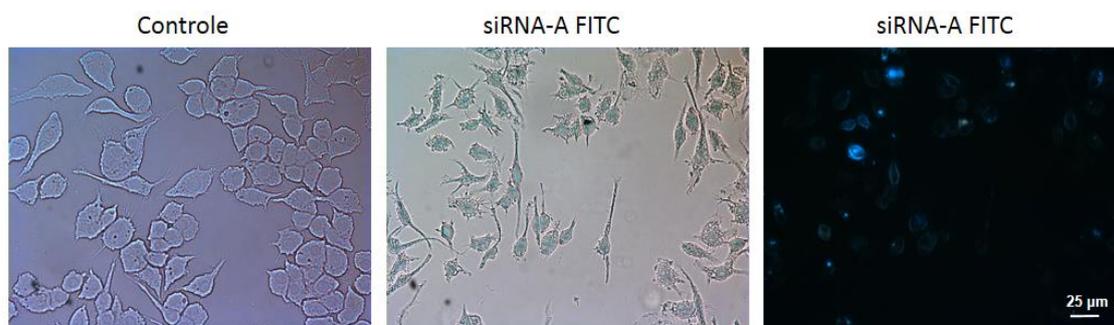


Figura 25. Padronização da transfecção de siRNA em macrófagos murinos. Células Raw 264.7 foram transfetadas com a concentração de 0,8 μM de siRNA-A e 0,4 μM de reagente de lipídico. Microscopia de campo claro de Raw 264.7 não transfetada (Controle). Microscopia de campo claro e fluorescência de Raw.264.7 transfetada com siRNA-A. (FITC). Imagens obtidas através da câmera AxioCam utilizando o microscópio Zeiss AxioPlan, após 4 horas de transfecção. Objetiva de 40x

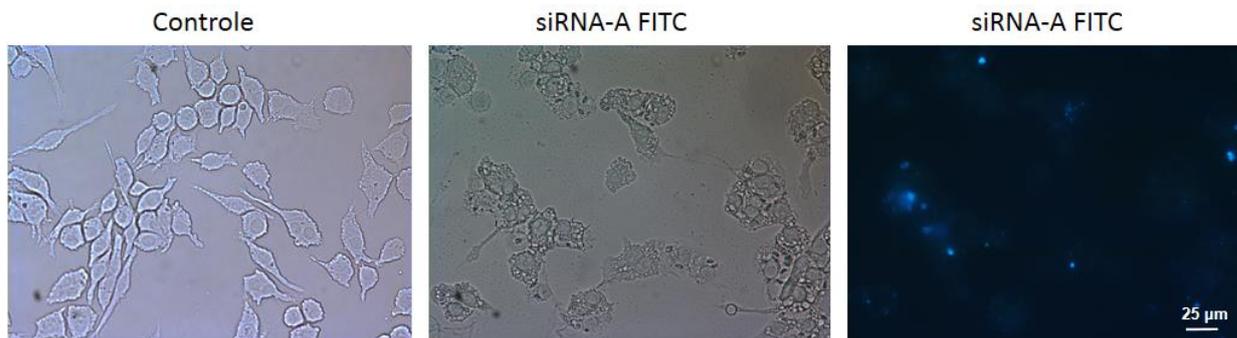


Figura 26. Padronização da transfecção de siRNA em Raw 264.7 infectadas por *T. gondii*. Células Raw 264.7 foram transfectadas com a concentração de 0,8 μM de siRNA-A e 0,4 μM de reagente de lipídico. Microscopia de campo claro de Raw 264.7 não transfectada (Controle). Microscopia de campo claro e fluorescência de Raw.264.7 infectada e transfectada com siRNA-A. (FITC). Imagens obtidas através da câmera AxioCam utilizando o microscópio Zeiss Axioplan, após 4 horas de transfecção. Objetiva de 40x

A viabilidade das células Raw 264.7 infectadas por *T. gondii* após 18 horas de tratamento utilizando siRNA-A (controle negativo) e inibidores foi avaliada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT.

Um siRNA controle foi utilizado para verificar se a metodologia padronizada por microscopia de fluorescência poderia interferir na viabilidade celular. Este siRNA é um controle negativo para experimentos de transfecção, que consiste em uma sequência codificada que não conduzirá à degradação específica de qualquer mensagem celular. Foram utilizados como controles, macrófagos infectados não transfectados e macrófagos transfectados.

Como observado na figura 27, houve redução da viabilidade celular nas células infectadas e nas células infectadas e transfectadas de forma similar. A transfecção não foi capaz de reduzir a viabilidade dos macrófagos não infectados (cinza escuro). A redução da viabilidade nos macrófagos infectados foi moderada.

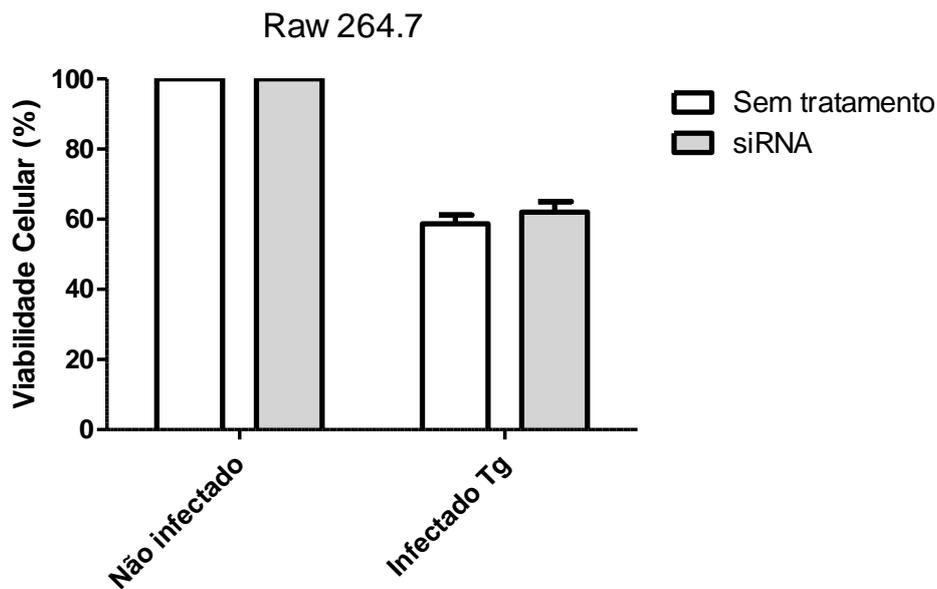


Figura 27. Efeito da transfecção de siRNA na viabilidade de macrófagos não infectados e infectados por *T. gondii*. Avaliação da viabilidade pelo ensaio de MTT após 24 h de infecção (n=3). siRNA adicionado 6 hora após infecção. Meio RPMI utilizado como controle.

5.3.2 siRNAs específicos reduzem a expressão de MT1-MMP e CD147 em macrófagos infectados por *T. gondii*.

Para determinar a eficácia dos siRNAs utilizados como silenciadores gênicos, analisou-se por imunofluorescência a expressão destas moléculas na membrana dos macrófagos após 24 horas de infecção e 18 horas de transfecção com siRNAs específicos quando comparados ao máximo de expressão em macrófagos infectados sem a transfecção. Células não infectadas e transfectadas foram utilizadas como controle.

O padrão de expressão das proteínas foi avaliado de maneira qualitativa através das imagens obtidas por microscopia de fluorescência. O núcleo das células foi marcado por DAPI (azul) e as proteínas de interesse, analisadas individualmente, marcadas por Alexa Fluor 568 (vermelho). A fluorescência, por célula, das proteínas marcadas com Alexa Fluor 568 foi mensurada através do

cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). A expressão de MT1-MMP também foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando PE-CY5.

Em macrófagos infectados, a metaloproteinase de membrana, MT1-MMP, pode ser encontrada sobre parasitas no PV e difusa ou condensada no citoplasma dos macrófagos infectados. A transfecção do siRNA específico para MT1-MMP de acordo com protocolo desenvolvido por nosso grupo, promove redução significativa na expressão desta proteína nos macrófagos infectados quando comparados aos macrófagos infectados e não transfectados (Figura 28). Ainda na figura 28, é possível observar nas imagens redução na marcação sobre os parasitas e na condensação no citosol. Estes dados sugerem menor concentração de MT1-MMP no tempo avaliado promovido pelo silenciamento gênico utilizando o siRNA específico para MT1-MMP. A citometria de fluxo corrobora com os resultados obtidos por microscopia ao demonstrar redução da intensidade de fluorescência na maioria das células infectadas e transfectadas (Figura 29).

A transfecção com siRNA específico para CD147 também foi capaz de reduzir de maneira significativa a expressão desta molécula na membrana plasmática das células infectadas quando comparadas as infectadas sem transfecção (Figura 30). Ao observar o gráfico da fluorescência relativa, nota-se que ocorreu maior variação da expressão de CD147 nas células apenas infectadas, no entanto, o uso do siRNA nas células infectadas parece reduzir essa variação, modificando o perfil de expressão desta glicoproteína na superfície das células infectadas (Figura 30).

Estes resultados, em conjunto, demonstram que a utilização dos siRNAs específicos para MT1-MMP e CD147 podem reduzir *in vitro* a expressão destas moléculas nas superfícies dos macrófagos infectados, o que abre novos caminhos para a compreensão da participação de MT1-MMP e CD147 nos mecanismos de invasão e migração de macrófagos utilizados pelo *T. gondii* como “Cavalos de Tróia”.

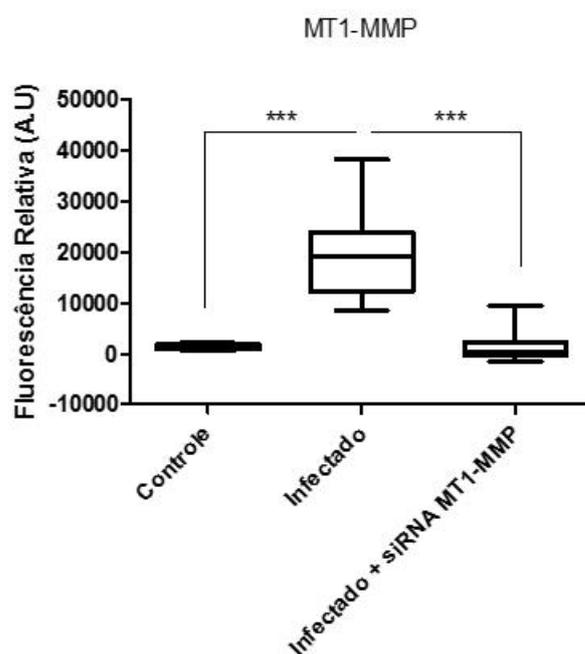
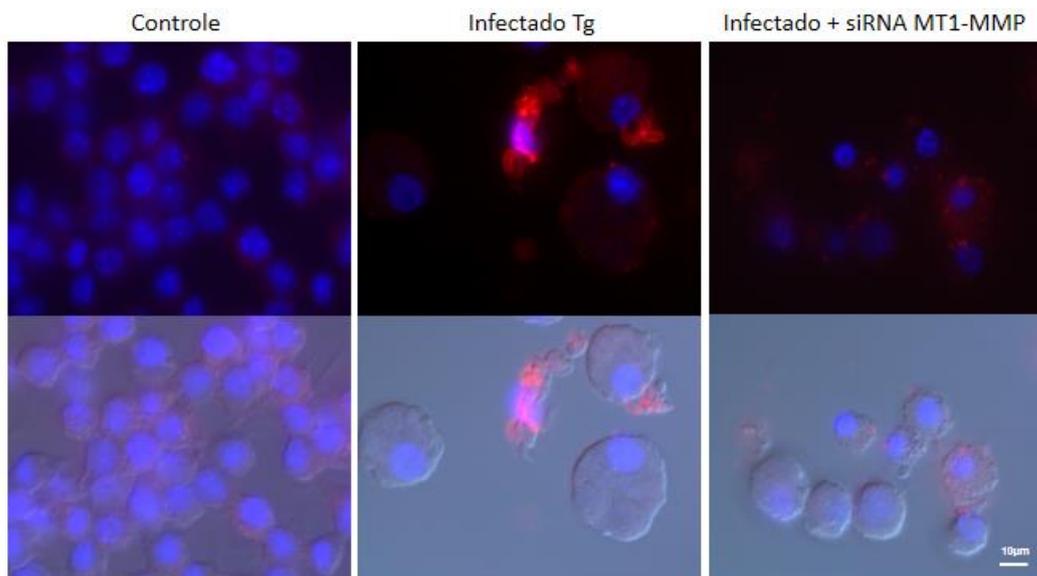


Figura 28. Expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por *T. gondii* e 18 h de transfecção com siRNA MT1-MMP. Células apenas infectadas (3:1) ou não infectadas e transfectadas foram utilizadas como controles. A) Microscopia de fluorescência, MT1-MMP (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste *T de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

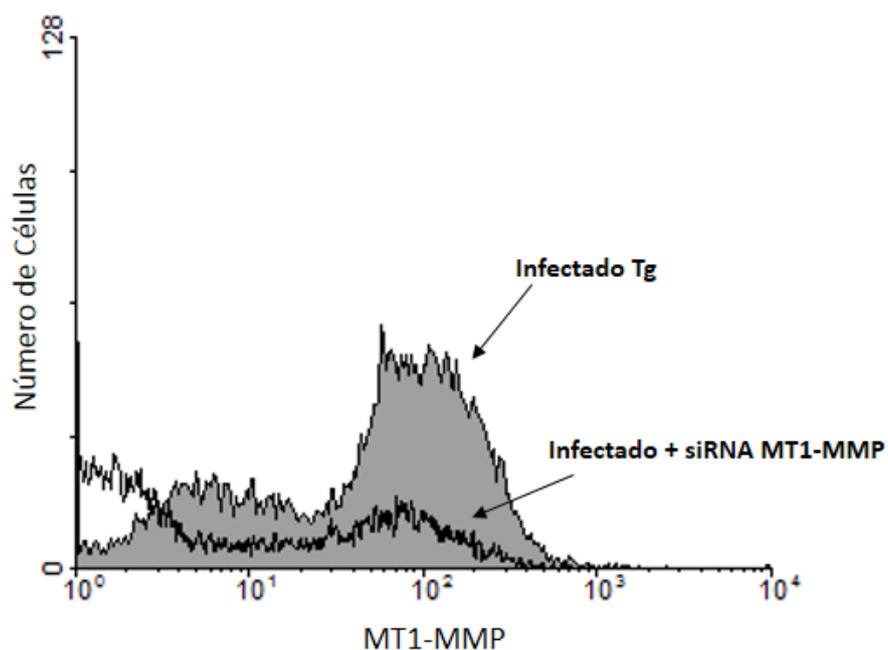


Figura 29. Citometria de fluxo para análise da expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por *T. gondii* e 18 h de transfecção. Análise da expressão realizada em células infectadas por *T. gondii* (3:1) comparadas ao controle não infectado. Relação entre a intensidade de fluorescência através da marcação de MT1-MMP com PE-CY 5 (eixo X) e quantidade de células (eixo Y)

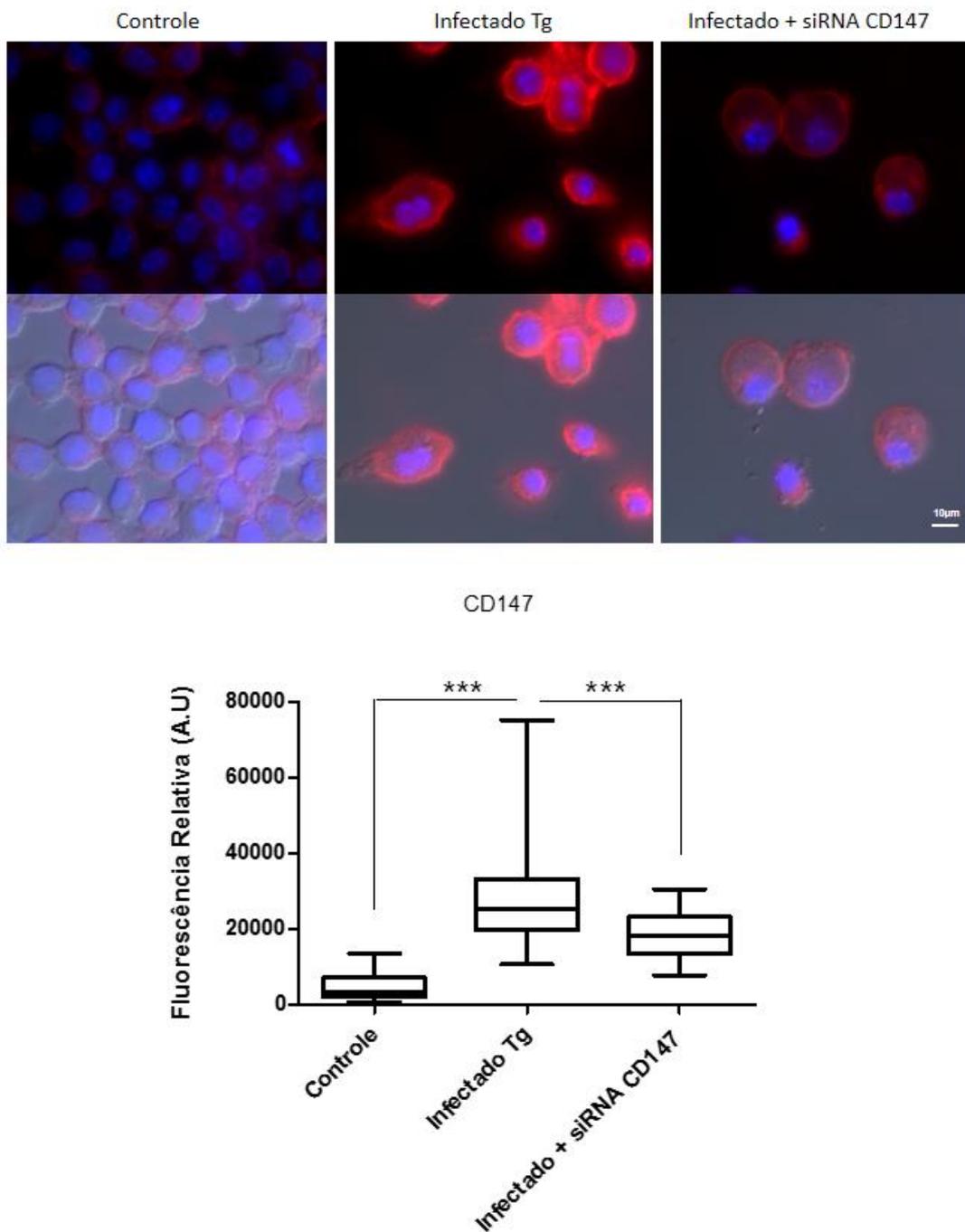


Figura 30. Expressão de CD147 em macrófagos após 24 horas de infecção por *T. gondii* e 18 h de transfecção com siRNA CD147. Células apenas infectadas (3:1) ou não infectadas e transfectadas foram utilizadas como controles. A) Microscopia de fluorescência, CD147 (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste *T de Student* não paramétrico bicaudal para determinar a relevância estatística

5.3.3 CD147 pode estar envolvida na ativação de MT1-MMP em macrófagos infectados por *T. gondii*

Para investigar o possível papel de CD147 na ativação de MT1-MMP na superfície de macrófagos infectados por *T. gondii*, nós utilizamos o siRNA específico para CD147, de acordo com o protocolo desenvolvido neste trabalho, para reduzir a expressão desta molécula e avaliar este efeito sobre a expressão de MT1-MMP.

Através da marcação com Alexa Fluor 568, figura 31, é demonstrado que a redução da expressão de CD147 promovida pelo siRNA específico reduz a expressão de MT1-MMP de forma significativa nos macrófagos infectados por *T. gondii*. Ao analisar as imagens representativas, pode-se observar que em macrófagos infectados e transfectados a fluorescência que indica presença de MT1-MMP está muito reduzida se comparada ao controle apenas infectado. Este resultado sugere que a expressão de MT1-MMP na superfície de macrófagos Raw 264.7 infectados por *T. gondii* seja dependente de CD147, similarmente ao que ocorre em células de tumor de mama metastáticas.

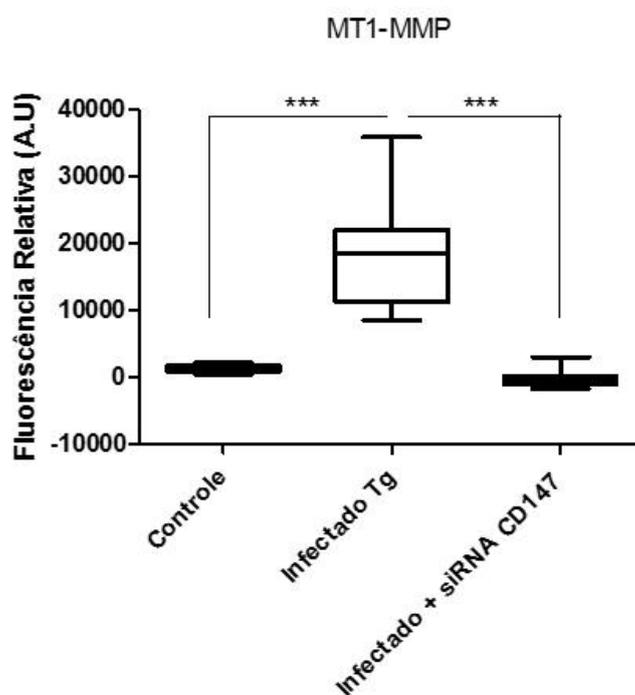
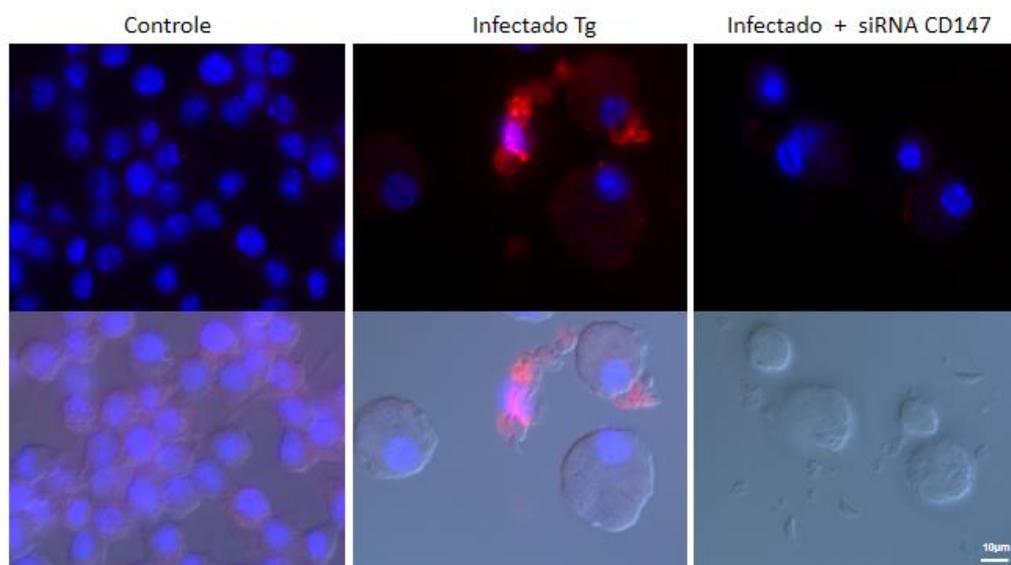


Figura 31. Expressão de MT1-MMP em macrófagos após 24 horas de infecção por *T. gondii* e 18 h de transfecção com siRNA CD147. Células apenas infectadas (3:1) ou não infectadas e transfectadas foram utilizadas como controles. A) Microscopia de fluorescência, MT1-MMP (Alexa Fluor 568 - vermelho) e núcleo celular (DAPI - azul). 100x. B) Média da intensidade da fluorescência (A.U), Alexa Fluor 568, mensurada através do cálculo da fluorescência celular corrigida total (TCCF). Teste *T de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

5.3.4 A utilização de siRNA específico para CD147 reduz a invasão/migração de macrófagos infectados por *T. gondii* em matriz extracelular tridimensional

A capacidade de invasão/migração de macrófagos infectados após transfecção dos siRNAs específicos para CD147 e MT1-MMP foi avaliada pelo ensaio *transwell* com presença da matriz 3D (Matrigel™). Com este ensaio foi possível analisar o efeito da redução da expressão destas moléculas na capacidade invasiva dos macrófagos pela matriz extracelular.

A figura 32 demonstra que a transfecção com siRNA específico para CD147 reduz significativamente o potencial invasivo/ migratório dos macrófagos infectados quando comparado aos macrófagos não transfectados. Sugerindo que a redução da expressão de CD147 previna o fenótipo hipermigratório promovido pelo *T. gondii*.

Em contrapartida, o siRNA específico para MT1-MMP não foi capaz de reduzir a capacidade invasiva das células infectadas (Figura 33). Ao analisar as imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência, é possível observar grande quantidade de macrófagos infectados e taquizoítos livres após transfecção. Este resultado utilizando siRNA MT1-MMP demonstra que a migração de *T. gondii* é um processo complexo que envolve a interação de uma grande variedade de moléculas. Deste modo, é possível que a redução apenas da expressão de MT1-MMP não interfira na capacidade invasiva das células infectadas sobre a matriz extracelular.

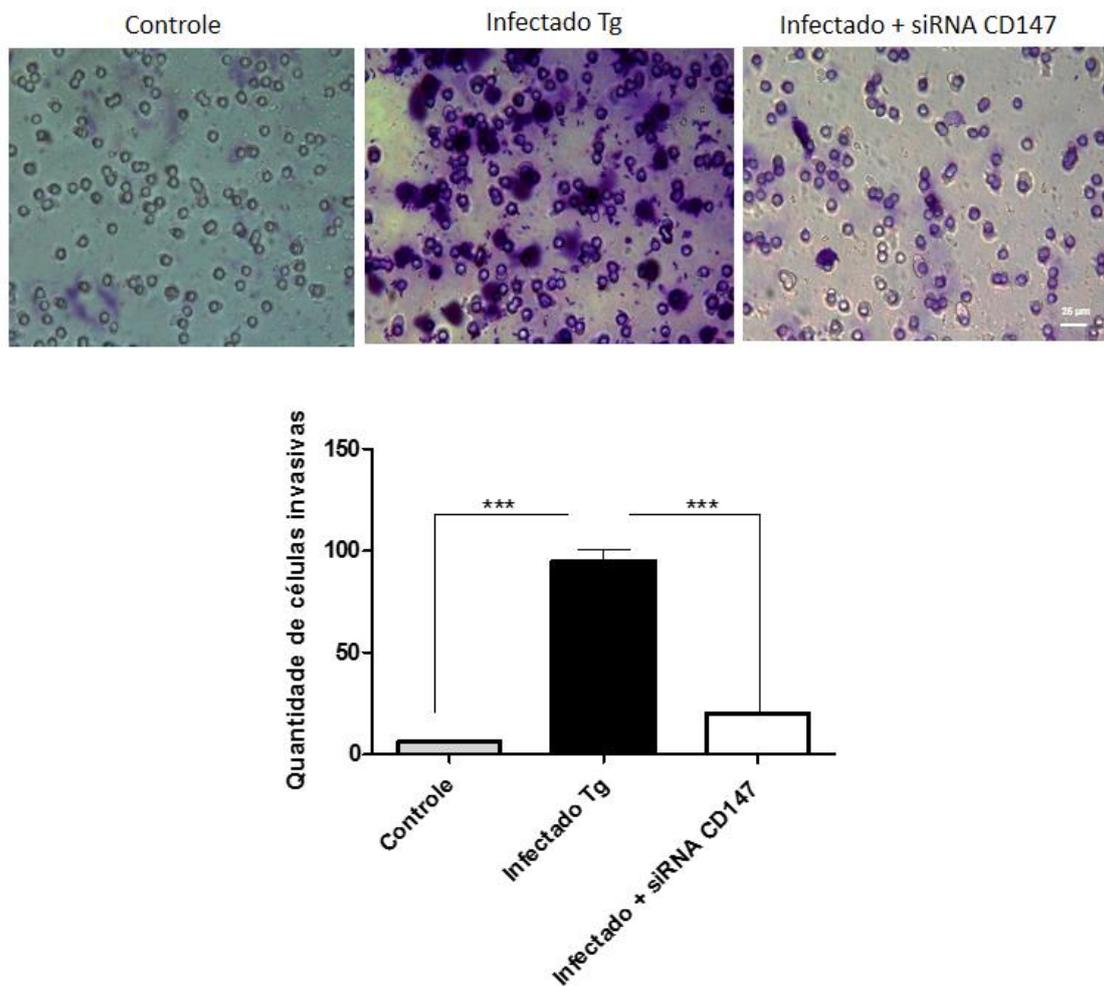


Figura 32. Invasão e migração de macrófagos infectados por *T. gondii* após transfecção com siRNA específico para CD147. Avaliação feita com 24 horas de infecção e 18 h de transfecção com siRNA CD147. Células apenas infectadas (3:1) ou não infectadas e transfectadas foram utilizadas como controles A) Células invasivas coradas com cristal violeta (roxo) e imagens obtidas por microscopia óptica. Objetiva de 40x B) Análise estatística após quantificação das células invasivas a partir de 3 imagens independentes (n = 3). Objetiva de 20x. Teste *t de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

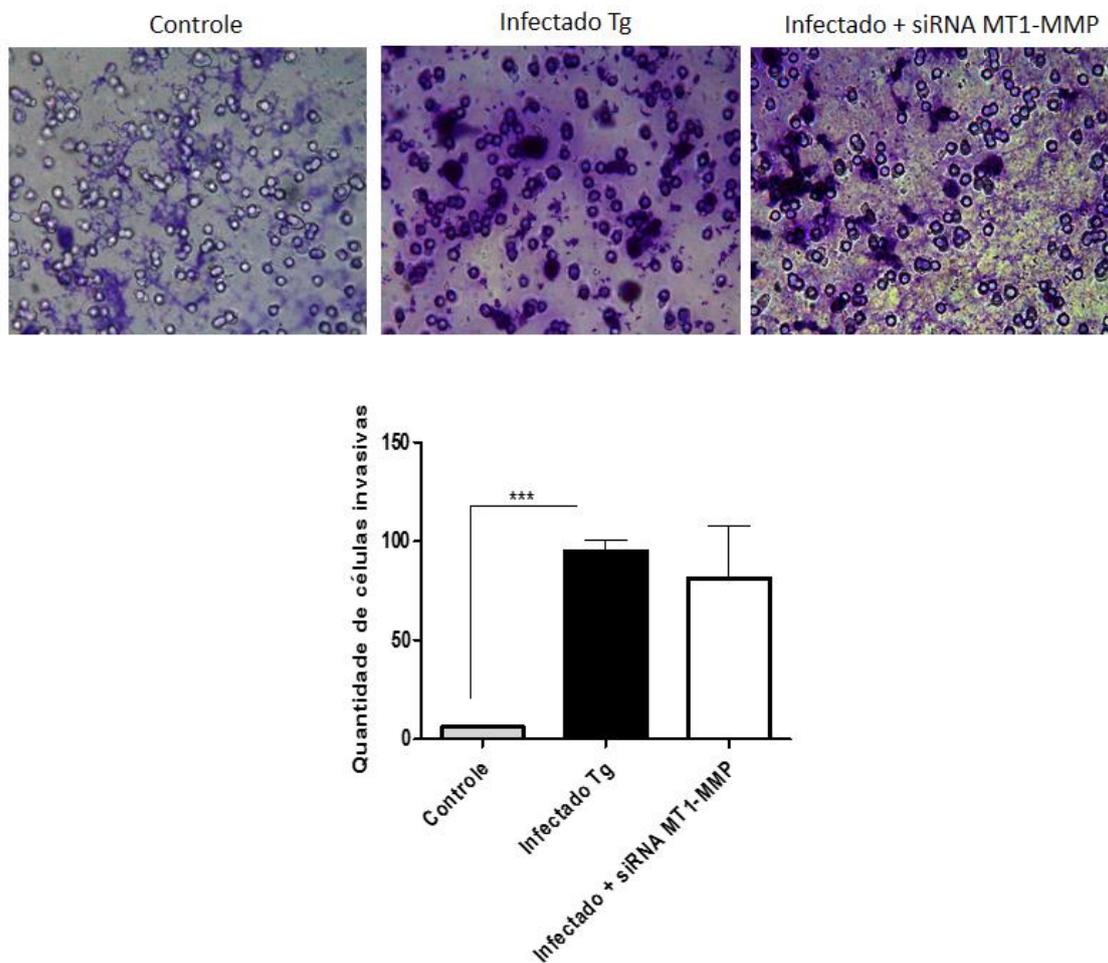


Figura 33. Invasão e migração de macrófagos infectados por *T. gondii* após transfecção com siRNA específico para MT1-MMP. Avaliação feita com 24 horas de infecção e 18 h de transfecção com siRNA CD147. Células apenas infectadas (3:1) ou não infectadas e transfectadas foram utilizadas como controles A) Células invasivas coradas com cristal violeta (roxo) e imagens obtidas por microscopia óptica. Aumento 40x B) Análise estatística após quantificação das células invasivas a partir de 3 imagens independentes (n = 3). Objetiva de 20x. Teste t *de Student* não paramétrico bicaudal foi usado para determinar a relevância estatística

6. Discussão

O *Toxoplasma gondii* é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro a seu favor e atingir sítios imunoprivilegiados, onde permanece em um ambiente controlado dentro de cistos quiescentes. Dentre as estratégias de disseminação, a capacidade do parasita em infectar leucócitos e utilizá-los como “Cavalos de Tróia” parece ser determinante para a travessia de barreiras teciduais e consequente acesso a regiões como o sistema nervoso central (SNC), retina e placenta (DA GAMA et al., 2004; LAMBERT et al., 2006; COURRET et al., 2006).

Nosso grupo demonstrou que metaloproteinases podem estar envolvidas na migração de macrófagos infectados por *T. gondii*, visto que a infecção *in vitro* de macrófagos murinos induz aumento da expressão de MT1-MMP e ADAM-10 nestas células, além de aumentar a concentração de MMP-9 ativa no sobrenadante destas culturas (SEIPEL et al., 2010).

Ao promoverem a desorganização e a fragmentação de componentes do estroma e da membrana basal, estas metaloproteinases podem facilitar o processo de transmigração dos leucócitos infectados, de maneira similar ao que ocorre em células metastáticas (FRANZ et al., 2002). Portanto, o estudo da expressão e regulação de metaloproteinases em macrófagos infectados por *T. gondii* pode fornecer novos conhecimentos sobre o controle molecular envolvido na migração de células infectadas por este parasita.

Com o objetivo de melhor compreender a participação das metaloproteinases de membrana, como MT1-MMP e ADAM-10, na migração de macrófagos infectados por *T. gondii*, nós inicialmente avaliamos o perfil de expressão destas moléculas nas primeiras 24 horas de infecção. Através das análises realizadas por imunofluorescência e citometria de fluxo foi possível confirmar o aumento da expressão de MT1-MMP e ADAM-10 nos macrófagos infectados, como já verificado através de citometria de fluxo por Seipel e colaboradores (2010). Além disso, nós demonstramos que a expressão destas moléculas aumenta proporcionalmente ao tempo de infecção e que MT1-MMP e ADAM-10 se localizam no vacúolo parasitóforo (PV) (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12).

A expressão elevada de MT1-MMP é observada em uma ampla variedade de cânceres humanos, incluindo os de pulmão, cólon, fígado, mama, cérebro, ovário e útero (HABELHAH et al., 1999; NAKADA et al., 1999; ZHAI et al., 2005) refletindo o papel crucial de MT1-MMP na invasão da matriz extracelular pelas células tumorais e possivelmente dos macrófagos infectados por *T. gondii* (SABEH et al., 2004; TURUNEN et al., 2017).

Através da microscopia de fluorescência, nós demonstramos que além de estar altamente expressa nos macrófagos infectados, a MT1-MMP pode ser localizada na membrana celular, difusa no citoplasma ou condensada próxima ao núcleo (Figura 9). Este perfil de expressão, também encontrado em diferentes linhagens tumorais, pode indicar uma interação dinâmica de eventos de tráfego exocíticos e endocíticos após a infecção, que controlam a atividade desta enzima (GINGRAS e BÉLIVEAU, 2010).

A presença de MT1-MMP sobre taquizoítos de *T. gondii* no interior e no exterior dos macrófagos (Figura 9) também foi observada, e pode sugerir que este parasita utilize MT1-MMP do hospedeiro para migrar de maneira independente e/ou modular a resposta imunológica. No entanto, mais experimentos são necessários para apoiar esta hipótese.

A MT1-MMP participa da clivagem de vários componentes da matriz extracelular (D'ORTHO et al., 1997; OHUCHI et al., 1997) e também da ativação de pro-MMP-2 (ITOH et al., 2001) e pro-MMP-13 (KNÄUPER et al., 1996). Além disso, pode processar vários componentes da membrana celular, como a subunidade pro- $\alpha 5$ de integrinas (DERYUGINA et al., 2002a) e CD44 (KAJITA et al., 2001) que, inclusive, está presente em maior concentração no sobrenadante dos macrófagos infectados por *T. gondii*, como demonstrado por Seipel e colaboradores (2010).

De maneira similar a MT1-MMP, ADAM-10 interage diretamente com proteínas da matriz extracelular e com proteínas transmembranares (DREYMUELLER et al., 2017). Ao interagir com seus substratos, ADAM-10 promove proteólise do substrato próximo à superfície celular, resultando na liberação de um ectodomínio solúvel e na produção de um fragmento associado à célula que consiste em um domínio transmembrar e citoplasmático (HUOVILA et al., 2005).

Na Figura 12, através da utilização do anticorpo específico para a região C-terminal de ADAM-10, foi demonstrada a expressão desta molécula na superfície e citoplasma das células infectadas. Este resultado sugere o envolvimento desta metaloproteinase nas atividades relacionadas à membrana, como *shedding* e sinalização intracelular, como a sinalização Notch (YANG et al., 2015).

Também há evidências de que a sinalização intracelular feita por fragmentos de ADAM-10 torne os substratos mais suscetíveis à clivagem. Em CD44 por exemplo, a fosforilação da região citoplasmática induz mudanças conformacionais e/ou dimerização na região extracelular desta molécula, o que promove a posterior clivagem por ADAM-10 liberando o complexo CD44-MMP-9 (HARTMANN et al., 2015; PARRA et al., 2015).

Schuindt e colaboradores em 2012, demonstraram que CD44 forma complexos multi-proteicos com MMP-9, uPAR e TIMP-1 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados por *T. gondii*. Portanto, ADAM-10 e MT1-MMP podem ser fortes candidatas na regulação da formação destes complexos, sugerindo semelhanças com as cascatas de sinalização envolvidas na migração de células metastáticas (NAGANO et al., 2004; STRONGIN, 2010).

A proteína CD147 super-expressa em diferentes linhagens tumorais, também pode estar envolvida na migração e acessibilidade de leucócitos infectados a sítios imunoprivilegiados, visto que ativa metaloproteinases (MMP-9 e MT1-MMP) e promove o *shedding* de integrinas e CD44 (NABESHIMA et al., 2006; YURCHENKO et al., 2010). De fato, através da microscopia de fluorescência, nós demonstramos pela primeira vez que o *T. gondii* aumenta a expressão de CD147 na linhagem Raw 264.7 nas primeiras 24 horas de infecção (figura 13).

O perfil de expressão de CD147 (Figura 14), concentrado em áreas marginais dos macrófagos infectados, é similar ao encontrado em câncer hepático (DAI et al., 2009), câncer do colo de útero (PUSHKARSKY et al., 2005) e melanoma (KANEKURA et al., 2002). Também é observado perfil de expressão marginal em macrófagos infectados por *Listeria monocytogenes*, um patógeno bacteriano intracelular. Nestes macrófagos os níveis de CD147 influenciam diretamente nas propriedades cito-invasivas de *L. monocytogenes* (TILL et al., 2008).

A CD147 é expressa em níveis basais em eritrócitos, é essencial para a invasão de parasitas do gênero *Plasmodium* (*P. falciparum* e *P. vivax*) causadores da malária. Sendo um receptor para a proteína RH5 dos merozoítos, a CD147 possibilita a entrada do parasita nas células do hospedeiro (CROSNIER et al., 2011; WRIGHT., 2015). Além disso, parece ser essencial para o crescimento intracelular de *P. vivax* (RATHORE et al., 2017).

Por apresentar afinidade a diferentes substratos, CD147 pode apresentar múltiplas funções na infecção de macrófagos por *T. gondii*, incluindo migração, sinalização celular e influência nas propriedades de invasão do parasita. Portanto, ao demonstrar super-expressão de CD147 em macrófagos infectados, este trabalho abre novos caminhos a serem explorados sobre o papel desta glicoproteína no complexo mecanismo de interação parasita-hospedeiro.

Após analisar o perfil de expressão de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 na superfície dos macrófagos infectados por *T. gondii*, nós avaliamos por microscopia de fluorescência a influência da furina convertase e γ -secretase no processamento/regulação destas moléculas utilizando inibidores específicos. Nossos resultados demonstraram que a furina convertase pode participar do processamento de MT1-MMP e γ -secretase da regulação de ADAM-10 através da via de sinalização Notch, em macrófagos infectados por *T. gondii* (Figura 17 e 20).

A redução da expressão de MT1-MMP na presença do inibidor de furina corrobora com diferentes trabalhos que mostram que o pró-domínio inibidor de MT1-MMP é clivado por furinas convertases no Trans Golgi network regulando assim a atividade funcional de MT1-MMP (IMAI et al., 1996; SATO et al., 1996; YANA e WEISS, 2000; ANDERS et al., 2001; STAWOWY et al., 2004). Por outro lado, o inibidor de furina não reduziu a expressão de CD147 ou de ADAM-10 nos macrófagos infectados (Figura 18 e 19), sugerindo ativação por vias de sinalização intracelular independente de pró-proteínas convertases (MARETZKY et al., 2015).

Apesar do inibidor de furina não ter efeito sobre a expressão de ADAM-10, o inibidor de γ -secretase foi capaz de reduzir significativamente a expressão desta molécula na superfície dos macrófagos infectados (Figura 20). Este resultado confirmou dados da literatura que demonstram a importância da γ -secretase

para a via de sinalização Notch. ADAM-10 provoca o *shedding* do receptor Notch que por sua vez é clivado pelo complexo γ -secretase presente na membrana celular. Após clivagem, os fragmentos intracelulares liberados controlam a transcrição de vários genes, inclusive genes que regulam a expressão de ADAM-10 na membrana (DREYMUELLER et al., 2017).

Ao demonstrar que furina e γ -secretase estão envolvidas na regulação/processamento de metaloproteinases como MT1-MMP e ADAM-10, pode-se deduzir que estas proteínas participam indiretamente da regulação de MMPs secretadas e *shedding* de proteínas transmembranares também em células infectadas por *T. gondii*. Através do ensaio de migração *transwell* utilizando matriz tridimensional, nós avaliamos o efeito dos inibidores destas vias na invasão e migração dos macrófagos infectados por *T. gondii*.

Como descrito em muitos trabalhos, a furina convertase promove proliferação celular, invasão e metástase de células tumorais (DE CICCIO et al., 2005; SCAMUFFA et al., 2008; FU et al., 2012). Seu papel na progressão tumoral está relacionado com o processamento de moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1R), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento semelhante a insulina 2 (IGF-2), bem como MT1-MMP (HOTARY et al., 2000; YANA et al., 2000; DE CICCIO et al., 2004; ARSENAULT et al., 2012).

Nossos resultados demonstraram que o inibidor de furina reduz consideravelmente o potencial invasivo dos macrófagos infectados por *T. gondii*, sugerindo um papel similar ao da progressão do câncer. No entanto, mais estudos são necessários para entender a participação desta pró-convertase no processamento de moléculas, além da MT1-MMP, envolvidas na migração dos macrófagos infectados.

O inibidor de γ -secretase, como esperado, também foi capaz de reduzir o potencial invasivo das células infectadas por *T. gondii*, provavelmente com participação na sinalização Notch que atua nas decisões do destino das células, na diferenciação celular, adesão, invasão e migração (FLUHRER e HAASS, 2007; DE STROOPER e ANNAERT, 2010; ZHAO, 2010; DIAZ-PADILLA et al.,

2015), logo, a inibição desta via pode afetar todos estes mecanismos. De fato, células de câncer coloretal, células endoteliais microvasculares e células de metástase cerebral, tratadas com o mesmo inibidor de γ -secretase (DAPT) utilizado neste trabalho, diminuíram o potencial invasivo via inibição da sinalização Notch (NAM et al., 2008; GAO et al., 2013; LI et al., 2017). Portanto, nossos resultados sugerem que a via de sinalização Notch esteja envolvida na migração dos macrófagos infectados por *T. gondii*.

Solanas e colaboradores (2011) demonstraram que ADAM-10 também desempenha um papel durante o desenvolvimento e a homeostase do epitélio auto-renovável no intestino. A superexpressão condicional influencia na compartimentalização das células em tecidos epiteliais, bem como na adesão e polaridade de células migratórias dentro de um tecido tão complexo (GLOMSKI et al., 2011). Além disso, o desenvolvimento do endotélio depende da expressão de ADAM-10. A inativação desta protease em células endoteliais de camundongos (KISANUKI et al., 2001) leva à maior ramificação e densidade da vasculatura da retina, veias hepáticas subcapsulares aberrantes, glomérulos alargados e pólipos intestinais. Essas descobertas evidenciam o papel de ADAM-10 como modulador central das decisões do destinos de células através do endotélio, e com estas características também poderia influenciar na migração de macrófagos infectados através das barreiras endoteliais.

Uma das estratégias para se conhecer a função de determinado gene são os experimentos de perda de função. Essa abordagem consiste em impedir que o gene estudado gere a proteína por ele codificada, com o propósito de analisar as consequências ou o fenótipo decorrente dessa inibição em células cultivadas (BARBOSA e LIN, 2004). Para avaliar o papel de MT1-MMP e CD147 na migração dos macrófagos Raw 264.7 infectados por *T. gondii*, nós desenvolvemos um protocolo de silenciamento gênico utilizando RNAs de interferência (siRNAs) específicos.

Ao utilizar diferentes concentrações de siRNAs não específico conjugado a FITC e lipofectante em macrófagos não infectados, foi possível escolher a melhor combinação de reagentes a ser utilizada nos experimentos com siRNAs com alvos específicos. Nossas análises qualitativas demonstraram que a melhor

combinação também poderia ser utilizada para macrófagos infectados (Figura 25 e 26). Como esperado, a eficiência da transfecção em macrófagos infectados é menor, visto que a infecção aumenta a concentração de enzimas que podem degradar o material genético exógeno (PALUDAN et al., 2013)

Através do ensaio de viabilidade por MTT, demonstramos que a própria infecção, na concentração de 3 parasitas por célula, reduz em 35-40% a porcentagem de células viáveis. No entanto deve ser considerado o fato das células não se reproduzirem com a mesma eficiência que o controle, após infecção. Ao comparar células infectadas com células infectadas e transfectadas, não houve diferença na porcentagem de células viáveis, o que garantiu a utilização dos siRNAs nas concentrações com maior eficiência de transfecção (Figura 27).

A quantidade de macrófagos infectados foi levada em consideração para a escolha do tempo nas análises de expressão de MT1-MMP e CD147 após transfecção, visto que após 24 horas de infecção, como demonstrado por Lee e colaboradores (2013), o *T. gondii* é capaz de reduzir a proliferação das células parasitadas.

A eficiência da transfecção e consequente silenciamento promovido pelos siRNAs específicos foi analisada por microscopia de fluorescência para MT1-MMP e CD147 e por citometria de fluxo para MT1-MMP. Os resultados demonstrados aqui evidenciam a capacidade da metodologia proposta em reduzir de maneira significativa a expressão de MT1-MMP e CD147 nos macrófagos infectados por *T. gondii* (Figuras 28, 29 e 30). No entanto, a utilização de técnicas como Western blot e RT-PCR poderiam respaldar ainda mais estes resultados.

A transfecção do siRNA específico para CD147 foi capaz de reduzir significativamente a expressão de MT1-MMP (Figura 31). A CD147 como já demonstrado em muitos trabalhos, é capaz de estimular a produção de MMPs como MMP-1, -2, -3, -9 e MT1-MMP (NABESHIMA et al., 2006; YURCHENKO et al., 2010). Grass e colaboradores em 2012, demonstraram que a regulação positiva de CD147 em células epiteliais de mama não-invasivas também é

suficiente para induzir um fenótipo invasivo caracterizado por aumento da expressão de MT1-MMP. Isso nos leva a sugerir, pelos resultados aqui obtidos, que na infecção de macrófagos por *T. gondii* a CD147 pode regular positivamente a expressão de MT1-MMP.

Ao avaliar o papel de CD147 na capacidade de invasão/migração de macrófagos infectados sobre matriz 3D (Matrigel™), nós demonstramos que macrófagos com alta expressão de CD147 na membrana plasmática apresentam grande habilidade invasiva. No entanto, macrófagos transfectados com siRNA de CD147 tiveram a capacidade invasiva reduzida significativamente (Figura 32). Este resultado confirma a importância de CD147 na promoção da migração/invasão de macrófagos infectados por *T. gondii*.

A redução na expressão de MT1-MMP, utilizando siRNA MT1-MMP, não interferiu na capacidade invasiva dos macrófagos infectados (Figura 33). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que nem todas as células com fenótipo hipermigratório apresentem necessariamente super-expressão de MT1-MMP (ARTYM et al., 2006; FIGUEIRA et al., 2009; KÖHRMANN et al., 2009). Em linhagem de câncer de mama (MCF7), por exemplo, o baixo nível de expressão de MT1-MMP está relacionado com maior capacidade invasiva sobre matriz 3D (CEPEDA et al., 2016). Além disso, este resultado é consistente com estudos de cultura de células metastáticas em matriz extracelular, que demonstram que a baixa expressão de MT1-MMP não impede o potencial invasivo destas células (MORI et al., 2014; PETRIE et al., 2017).

A MT1-MMP, assim como as outras moléculas transmembranares estudadas aqui, é multifuncional e por isso afeta comportamentos celulares através de mecanismos proteolíticos e não proteolíticos. Provavelmente, na migração de macrófagos infectados por *T. gondii*, seu papel na sinalização intracelular e regulação de CD44 e integrinas se sobressaia ao seu papel na degradação da matriz extracelular.

Baseado nos resultados do nosso grupo de pesquisa e em dados da literatura apresentados nesta tese, propomos uma modelo que demonstra o fenótipo invasivo adquirido por macrófagos murinos após infecção por *T. gondii*. A figura 34 apresenta as moléculas envolvidas na cascata de invasão/ migração

dos macrófagos infectados, bem como suas prováveis vias de regulação e/ou processamento.

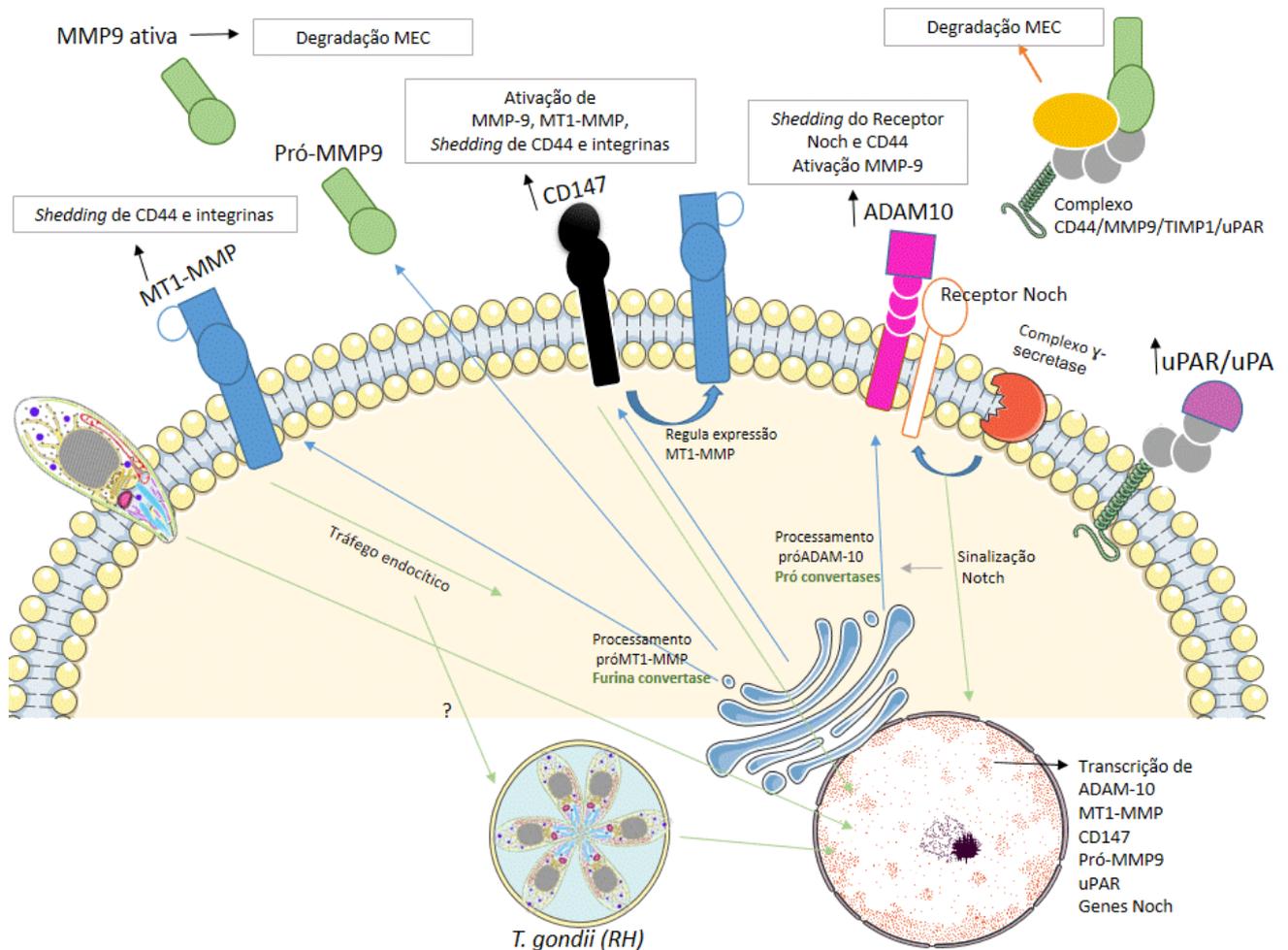


Figura 34. Envolvimento das MMPs no fenótipo hipermigratório de macrófagos murinos infectados por *T. gondii*. A infecção por *T. gondii* aumenta a expressão de MT1-MMP, CD147, ADAM-10 e uPAR na membrana plasmática dos macrófagos infectados, além disso, aumenta a secreção de próMMP9 e do complexo multiproteico formado por CD44, MMP9, TIMP1 e uPAR. Coletivamente, este fenótipo regula a capacidade invasiva e migratória destas células. Desenho autoral, realizado no programa PowerPoint (2013), com imagens obtidas do banco de imagens da *Servier Medical Art*.

Em conjunto, nós demonstramos que MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 são super-expressas nos macrófagos infectados por *T. gondii* com perfil de expressão similar ao de linhagens metastáticas. Além disso, a expressão de MT1-MMP é dependente de furina convertase e de ADAM-10 é mediada pelo complexo γ -secretase. A glicoproteína CD147 regula a expressão de MT1-MMP e é essencial para a migração dos macrófagos infectados em matriz extracelular tridimensional. As proteínas γ -secretase e furina convertase também são necessárias para a migração das células infectadas em matriz extracelular 3D. Portanto, os resultados aqui apresentados, fornecem novas informações para a compreensão da relação parasita-hospedeiro e apresenta novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos que previnam a disseminação de *T. gondii* em seus hospedeiros.

7. Conclusões

- A infecção por *T. gondii* aumenta a expressão de MT1-MMP, ADAM-10 e CD147 em macrófagos murinos, promovendo um fenótipo hipermigratório;
- A expressão de MT1-MMP induzida pela infecção é dependente de furina-convertase
- A expressão de ADAM-10 é mediada pelo complexo γ -secretase nos macrófagos infectados, com possível influencia na sinalização Notch;
- A CD147 induzida pela infecção por *T. gondii* regula a expressão de MT1-MMP
- A CD147 e as vias de furina-convertase e γ -secretase estão envolvidas na invasão/migração dos macrófagos infectados em matriz extracelular tridimensional.

8. Referências

1. AHN, Hye-Jin et al. STAT6 activation by *Toxoplasma gondii* infection induces the expression of Th2 CC chemokine ligands and B clade serine protease inhibitors in macrophage. **Parasitology research**, v. 105, n. 5, p. 1445, 2009.
2. AMAR, Sabrina; SMITH, Lyndsay; FIELDS, Gregg B. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. 2017.
3. ANDERS, Lars et al. Furin-, ADAM 10-, and γ -secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of β -catenin's transcriptional activity. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 10, p. 3917-3934, 2006.
4. ARSENAULT, Dominique; LUCIEN, Fabrice; DUBOIS, Claire M. Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-golgi network to the cell surface. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 2, p. 789-800, 2012.
5. ARTYM, Vira V. et al. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. **Cancer research**, v. 66, n. 6, p. 3034-3043, 2006.
6. BACIU, Peter C. et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro- αv integrin regulates cross-talk between $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins in breast carcinoma cells. **Experimental cell research**, v. 291, n. 1, p. 167-175, 2003.
7. BAKKEN, Andrew M. et al. Cell migration in response to the amino-terminal fragment of urokinase requires epidermal growth factor receptor activation through an ADAM-mediated mechanism. **Journal of vascular surgery**, v. 49, n. 5, p. 1296-1303, 2009.
8. BANCHEREAU, Jacques et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.
9. BARBOSA, Angela Silva; LIN, Chin Jia. Gene silencing with RNA interference: a novel tool for the study of physiology and pathophysiology of adrenal cortex. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 5, p. 612-619, 2004.
10. BARRAGAN, Antonio; BROSSIER, Fabien; SIBLEY, L. David. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005.

11. BARRAGAN, Antonio; SIBLEY, L. David. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.
12. BARRAGAN, Antonio; SIBLEY, L. David. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002.
13. BECK, Josh R. et al. RON5 is critical for organization and function of the *Toxoplasma* moving junction complex. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1004025, 2014.
14. 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. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4126-4130, 1993.
15. BESTEIRO, Sébastien. Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan parasites?. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 184, n. 1, p. 1-8, 2012.
16. BI, Jiajia et al. Basigin null mutant male mice are sterile and exhibit impaired interactions between germ cells and Sertoli cells. **Developmental biology**, v. 380, n. 2, p. 145-156, 2013.
17. BIJLI, Kaiser M. et al. Activation of Syk by protein kinase C- δ regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via tyrosine phosphorylation of RelA/p65. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14674-14684, 2008.
18. BISWAS, Chitra et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. **Cancer research**, v. 55, n. 2, p. 434-439, 1995.
19. BODE, W. et al. The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. In: **Intracellular Protein Catabolism**. Springer US, 1996. p. 1-11.
20. BOND, Judith S.; BEYNON, Robert J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Protein Science**, v. 4, n. 7, p. 1247-1261, 1995.
21. BOOTHROYD, John C.; GRIGG, Michael E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.
22. BORRIRUKWANIT, Kulrut et al. High threshold of β 1 integrin inhibition required to block collagen I-induced membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) activation of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). **Cancer cell international**, v. 14, n. 1, p. 99, 2014.

23. BRASIL, Thaís Rigueti Brasil et al. Host-Toxoplasma gondii coadaptation leads to fine tuning of the immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1080, 2017.
24. BRINCKERHOFF, Constance E.; MATRISIAN, Lynn M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 3, p. 207-214, 2002.
25. BUACHE, Emilie et al. Reduced secretion and expression of gelatinase profile in Toxoplasma gondii-infected human monocytic cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 359, n. 2, p. 298-303, 2007.
26. BURGESS, Andrew et al. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 28, p. 12564-12569, 2010.
27. BUTCHER, Barbara A. et al. Cutting edge: IL-10-independent STAT3 activation by Toxoplasma gondii mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3148-3152, 2005.
28. BUTCHER, Barbara A. et al. Toxoplasma gondii rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002236, 2011.
29. CARMEN, John C.; HARDI, Lucia; SINAI, Anthony P. Toxoplasma gondii inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 2, p. 301-315, 2006.
30. CARRALOT, Jean-Philippe et al. Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: a case study for optimization procedure. **Journal of biomolecular screening**, v. 14, n. 2, p. 151-160, 2009.
31. CARRUTHERS, Vern B.; GIDDINGS, Olivia K.; SIBLEY, L. David. Secretion of micronemal proteins is associated with Toxoplasma invasion of host cells. **Cellular microbiology**, v. 1, n. 3, p. 225-235, 1999.
32. CARRUTHERS, Vern B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. **European journal of cell biology**, v. 73, n. 2, p. 114-123, 1997.
33. CARRUTHERS, Vern B.; TOMLEY, Fiona M. Microneme proteins in apicomplexans. In: **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**. Springer New York, 2008. p. 33-45.

34. CEPEDA, Mario A. et al. Less is more: low expression of MT1-MMP is optimal to promote migration and tumourigenesis of breast cancer cells. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, p. 65, 2016.
35. CHANNON, Jacqueline Y.; SEGUIN, Rosanne M.; KASPER, Lloyd H. Differential Infectivity and Division of *Toxoplasma gondii* in Human Peripheral Blood Leukocytes. **Infection and immunity**, v. 68, n. 8, p. 4822-4826, 2000.
36. CHAO, Chun C. et al. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 3, p. 1246-1252, 1994.
37. CHARLIER, Caroline et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 1, p. 120-127, 2009.
38. CHEN, Xiang et al. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11323-11330, 2006.
39. CHENG, Yi et al. Organization of the mouse GP42/Basigin gene: a member of the Ig superfamily. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1217, n. 3, p. 307-311, 1994.
40. CHICHE, Johanna; RICCI, Jean-Ehrland; POUYSSÉGUR, Jacques. Tumor hypoxia and metabolism—towards novel anticancer approaches. In: **Annales d'endocrinologie**. Elsevier Masson, 2013. p. 111-114.
41. CHO, Sang Hyuk et al. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. **International journal of oncology**, v. 41, n. 1, p. 211-218, 2012.
42. CHUN, Tae-Hwa et al. MT1-MMP—dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. **J Cell Biol**, v. 167, n. 4, p. 757-767, 2004.
43. CLARK, Robin T. et al. T-cell production of matrix metalloproteinases and inhibition of parasite clearance by TIMP-1 during chronic *Toxoplasma* infection in the brain. **ASN neuro**, v. 3, n. 1, p. AN20100027, 2010.
44. COURRET, Nathalie et al. CD11c-and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-316, 2006.
45. CROSNIER, Cécile et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 534, 2011.

46. DA CRUZ PADRÃO, Juliana et al. Toxoplasma gondii infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. **Parasitology international**, v. 63, n. 5, p. 659-663, 2014.
47. DA GAMA, Leonardo M. et al. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with Toxoplasma gondii. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 14, p. 1287-1296, 2004.
48. DE CICCO, Ricardo López et al. Human carcinoma cell growth and invasiveness is impaired by the propeptide of the ubiquitous proprotein convertase furin. **Cancer research**, v. 65, n. 10, p. 4162-4171, 2005.
49. DE STROOPER, Bart; ANNAERT, Wim. Novel research horizons for presenilins and γ -secretases in cell biology and disease. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 26, p. 235-260, 2010.
50. DECASTRO, Rosana et al. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, n. 6, p. 1260-1265, 1996.
51. DEMITRACK, Elise S.; SAMUELSON, Linda C. Notch as a Driver of Gastric Epithelial Cell Proliferation. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 3, p. 323, 2017.
52. DENKERS, E. Y.; SHER, A. Role of natural killer and NK1+ T-cells in regulating cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection. 1997.
53. DENKERS, Eric Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by Toxoplasma gondii. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 193-203, 2003.
54. DENKERS, Eric Y.; GAZZINELLI, Ricardo T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.
55. DERYUGINA, Elena I. et al. Processing of integrin α v subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 9749-9756, 2002.
56. DIAZ-PADILLA, Ivan et al. A phase II study of single-agent RO4929097, a gamma-secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with recurrent platinum-resistant epithelial ovarian cancer: A study of the Princess Margaret, Chicago and California phase II consortia. **Gynecologic oncology**, v. 137, n. 2, p. 216-222, 2015.

57. D'ORTHO, Marie-Pia et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. **The FEBS Journal**, v. 250, n. 3, p. 751-757, 1997.
58. DREVETS, Douglas A.; LEENEN, Pieter JM; GREENFIELD, Ronald A. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 323-347, 2004.
59. DREYMUELLER, D. et al. Fine Tuning Cell Migration by a Disintegrin and Metalloproteinases. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.
60. DU, Jian et al. Toxoplasma gondii virulence factor ROP18 inhibits the host NF- κ B pathway by promoting p65 degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 18, p. 12578-12592, 2014.
61. DUBEY, J. P. Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradvzoites of-Different Strains of Toxoplasma gondii. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592-602, 1997.
62. DUBEY, J. P. et al. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed Toxoplasma gondii oocysts. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 5, p. 870-882, 1997.
63. DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.
64. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of Toxoplasma gondiitachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
65. DUBEY, Jitender Prakask, and C. P. Beattie. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc., 1988.
66. DUBOIS, Bénédicte et al. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 11, p. 1507, 1999.
67. DUFFY, Michael J. et al. Role of ADAMs in cancer formation and progression. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 1140-1144, 2009.
68. DUNAY, Ildiko R.; SIBLEY, L. David. Monocytes mediate mucosal immunity to Toxoplasma gondii. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 4, p. 461-466, 2010.

69. DUPONT, Christopher D.; CHRISTIAN, David A.; HUNTER, Christopher A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2012. p. 793-813.
70. DURU, Enrico A.; FU, Yuyang; DAVIES, Mark G. Protease-mediated human smooth muscle cell proliferation by urokinase requires epidermal growth factor receptor transactivation by triple membrane signaling. **journal of surgical research**, v. 192, n. 2, p. 254-262, 2014.
71. ELKINGTON, P. T. G.; O'KANE, C. M.; FRIEDLAND, J. S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, n. 1, p. 12-20, 2005.
72. FANJUL-FERNÁNDEZ, Miriam et al. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 3-19, 2010.
73. FELDMESSER, Marta; TUCKER, Stephanie; CASADEVALL, Arturo. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 273-278, 2001.
74. FIGUEIRA, Rita CS et al. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 20, 2009.
75. FINGLETON, B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 11, p. 479-491, 2006.
76. FLORES-BORJA, Fabian et al. Crosstalk between Innate Lymphoid Cells and Other Immune Cells in the Tumor Microenvironment. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.
77. FLUHRER, Regina; HAASS, Christian. Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family?. **Neurodegenerative Diseases**, v. 4, n. 2-3, p. 112-116, 2007.
78. FORNI, Diego et al. Positive selection underlies the species-specific binding of *Plasmodium falciparum* RH5 to human basigin. **Molecular ecology**, v. 24, n. 18, p. 4711-4722, 2015.
79. FRANZ, Clemens M.; JONES, Gareth E.; RIDLEY, Anne J. Cell migration in development and disease. **Developmental cell**, v. 2, n. 2, p. 153-158, 2002.
80. FU, Jian et al. Transgenic overexpression of the proprotein convertase furin enhances skin tumor growth. **Neoplasia**, v. 14, n. 4, p. 271-282, 2012.

81. FURTADO, João M. et al. Toxoplasma gondii migration within and infection of human retina. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e54358, 2013.
82. FURTADO, João M. et al. Toxoplasma gondii tachyzoites cross retinal endothelium assisted by intercellular adhesion molecule-1 in vitro. **Immunology and cell biology**, v. 90, n. 9, p. 912, 2012.
83. ROBERT-GANGNEUX, Florence; DARDÉ, Marie-Laure. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
84. GAO, Wei et al. Notch signalling pathways mediate synovial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. 6, p. 1080-1088, 2013.
85. GAVET, Olivier; PINES, Jonathon. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. **Developmental cell**, v. 18, n. 4, p. 533-543, 2010.
86. GAZZINELLI, Ricardo T. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 13, p. 6115-6119, 1993.
87. GAZZINELLI, Ricardo T. et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 6, p. 2533-2543, 1994.
88. GE, Heng et al. Functional relevance of protein glycosylation to the pro-inflammatory effects of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) on monocytes/macrophages. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117463, 2015.
89. GINGRAS, Denis; BÉLIVEAU, Richard. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 142-150, 2010.
90. GLOMSKI, Krzysztof et al. Deletion of Adam10 in endothelial cells leads to defects in organ-specific vascular structures. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1163-1174, 2011.
91. GOEBEL, Stefan; GROSS, Uwe; LÜDER, Carsten GK. Inhibition of host cell apoptosis by Toxoplasma gondii is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 19, p. 3495-3505, 2001.
92. GONCZY, Pierre et al. Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 331, 2000.

93. GRASS GD , TOOLE BP. How, with whom and when: An overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. **Bioscience Reports**, v. 36, 2016.
94. HABELHAH, Hasem et al. Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. **Oncogene**, v. 18, n. 9, 1999.
95. HÅKANSSON, Sebastian; CHARRON, Audra J.; SIBLEY, L. David. Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The EMBO journal**, v. 20, n. 12, p. 3132-3144, 2001.
96. HAKIMI, Mohamed-Ali; OLIAS, Philipp; SIBLEY, L. David. Toxoplasma effectors targeting host signaling and transcription. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 615-645, 2017.
97. HARTMANN, Monika et al. Inside-out regulation of ectodomain cleavage of cluster-of-differentiation-44 (CD44) and of neuregulin-1 requires substrate dimerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 28, p. 17041-17054, 2015.
98. HAVELAAR, A. H.; KEMMEREN, J. M.; KORTBEEK, L. M. Disease burden of congenital toxoplasmosis. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. 11, p. 1467-1474, 2007.
99. HILL, D., and J. P. Dubey. "Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention." *Clinical microbiology and infection* 8.10. 634-640. 2002
100. HIPPE, Diana et al. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by Toxoplasma gondii primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. **Infection and immunity**, v. 76, n. 7, p. 2905-2912, 2008.
101. HIPPE, Diana et al. Toxoplasma gondii infection confers resistance against BimS-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax. **Journal of cell science**, v. 122, n. 19, p. 3511-3521, 2009.
102. HOFF, Eleanor F.; CARRUTHERS, Vern B. Is Toxoplasma egress the first step in invasion?. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 6, p. 251-255, 2002.
103. HOTARY, Kevin et al. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. **The Journal of cell biology**, v. 149, n. 6, p. 1309-1323, 2000.

104. HOUGAARD, Susanne et al. Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 2, p. 261-267, 2000.
105. HU, Jialiang et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 6, p. 480, 2007.
106. HUA, Hui et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 23, p. 3853-3868, 2011.
107. HUNDHAUSEN, Christian et al. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1186-1195, 2003.
108. HUNTER, Christopher A. et al. Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 2818-2824, 1994.
109. HUNTER, Christopher A.; SIBLEY, L. David. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766, 2012.
110. HUOVILA, Ari-Pekka J. et al. Shedding light on ADAM metalloproteinases. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 7, p. 413-422, 2005.
111. IGAKURA, Tadahiko et al. A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. **Developmental biology**, v. 194, n. 2, p. 152-165, 1998.
112. IMAI, Kazushi et al. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. **Cancer Research**, v. 56, n. 12, p. 2707-2710, 1996.
113. ISHIBASHI, Yoshio et al. CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 101, n. 9, p. 1994-2000, 2004.
114. ISOZAKI, Takeo et al. ADAM-10 is overexpressed in rheumatoid arthritis synovial tissue and mediates angiogenesis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 65, n. 1, p. 98-108, 2013.

115. ISRAELSKI, DENNIS M.; REMINGTON, JACK S. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Infectious disease clinics of North America**, v. 2, n. 2, p. 429-445, 1988.
116. ITOH, Yoshifumi et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. **The EMBO journal**, v. 20, n. 17, p. 4782-4793, 2001.
117. ITOH, Yoshifumi; SEIKI, Motoharu. MT1-MMP: A potent modifier of pericellular microenvironment. **Journal of cellular physiology**, v. 206, n. 1, p. 1-8, 2006.
118. JENSEN, Kirk DC et al. Toxoplasma gondii rhopty 16 kinase promotes host resistance to oral infection and intestinal inflammation only in the context of the dense granule protein GRA15. **Infection and immunity**, v. 81, n. 6, p. 2156-2167, 2013.
119. JOGHETAEI, Nader et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane type 1-matrix metalloproteinase are expressed on tissue macrophages in calcific aortic stenosis and induce transmigration in an artificial valve model. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 142, n. 1, p. 191-198, 2011.
120. JOHNSON, Lawrence L.; SAYLES, Peter C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to Toxoplasma gondii in CD4-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 185-191, 2002.
121. JOIN-LAMBERT, Olivier F. et al. Listeria monocytogenes-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 2, p. 167-180, 2005.
122. KAJITA, Masahiro et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. **The Journal of cell biology**, v. 153, n. 5, p. 893-904, 2001.
123. KANEKURA, Takuro; CHEN, Xiang; KANZAKI, Tamotsu. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. **International journal of cancer**, v. 99, n. 4, p. 520-528, 2002.
124. KAUSHIK, Deepak Kumar; HAHN, Jennifer Nancy; YONG, V. Wee. EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. **Matrix Biology**, v. 44, p. 138-146, 2015.
125. KELLER, Philine et al. Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by Toxoplasma gondii reveals novel mechanisms of

- interference with host cell apoptosis. **FEMS microbiology letters**, v. 258, n. 2, p. 312-319, 2006.
126. KESSENBROCK, Kai; PLAKS, Vicki; WERB, Zena. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.
127. KHAN, Asis et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011.
128. KHAN, Imtiaz A. et al. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 6, p. e49, 2006.
129. KHUNKAEWLA, Panida et al. LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147. **Molecular immunology**, v. 45, n. 6, p. 1703-1711, 2008.
130. KIESEIER, Bernd C. et al. ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS. **Glia**, v. 42, n. 4, p. 398-405, 2003.
131. KIM, Bae-Hoon et al. IFN-inducible GTPases in host cell defense. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 4, p. 432-444, 2012.
132. KIM, Ji-Young et al. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF- κ B activation. **Yonsei Medical Journal**, v. 47, n. 6, p. 862-869, 2006.
133. KIM, Kami, and Louis M. Weiss. "*Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan." **International journal for parasitology** 34.3. 423-432. 2004
134. KINASHI, Tatsuo. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 7, p. 546-559, 2005.
135. KISANUKI, Yaz Y. et al. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. **Developmental biology**, v. 230, n. 2, p. 230-242, 2001.
136. KNÄUPER, Vera et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 29, p. 17124-17131, 1996.
137. KÖHRMANN, Andrea et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 188, 2009.

138. KOSUGI, Tomoki et al. CD147 (EMMPRIN/Basigin) in kidney diseases: from an inflammation and immune system viewpoint. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 7, p. 1097-1103, 2014.
139. LACHENMAIER, Sabrina M. et al. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood–brain barrier. **Journal of neuroimmunology**, v. 232, n. 1, p. 119-130, 2011.
140. LAMBERT, Henrik et al. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1611-1623, 2006.
141. LAMBERT, Henrik; BARRAGAN, Antonio. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 3, p. 292-300, 2010.
142. LANG, Christine; GROß, Uwe; LÜDER, Carsten GK. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 100, n. 2, p. 191-203, 2007.
143. LE GALL, Sylvain M. et al. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , L-selectin, and tumor necrosis factor α . **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 6, p. 1785-1794, 2009.
144. LEE, I.-Ping et al. *Toxoplasma gondii* is dependent on glutamine and alters migratory profile of infected host bone marrow derived immune cells through SNAT2 and CXCR4 pathways. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109803, 2014.
145. LEE, Youn-Jin et al. Proliferation of *Toxoplasma gondii* suppresses host cell autophagy. **The Korean journal of parasitology**, v. 51, n. 3, p. 279, 2013.
146. LEY, Klaus et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678, 2007.
147. LI, Jing et al. Rat Limbal Niche Cells Prevent Epithelial Stem/Progenitor Cells From Differentiation and Proliferation by Inhibiting Notch Signaling Pathway In Vitro Limbal Niche Cells Support Stem Cells by Inhibiting Notch. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 7, p. 2968-2976, 2017.
148. LI, Yu et al. HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection. **Histopathology**, v. 54, n. 6, p. 677-687, 2009.
149. LU, Cheng-You; LAI, Shih-Chan. Matrix metalloproteinase-2 and-9 lead to fibronectin degradation in astroglia infected with *Toxoplasma gondii*. **Acta tropica**, v. 125, n. 3, p. 320-329, 2013.

150. LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. In: **Role of Apoptosis in Infection**. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 219-237.
151. LÜDER, Carsten GK et al. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 8, p. 833-844, 2003.
152. LUFT, Benjamin J. et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Jama**, v. 252, n. 7, p. 913-917, 1984.
153. LUSTER, Andrew D.; ALON, Ronen; VON ANDRIAN, Ulrich H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182, 2005.
154. LÜTJEN, Sonja et al. Organ-and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. **Infection and immunity**, v. 74, n. 10, p. 5790-5801, 2006.
155. MAEDA, Kayaho et al. CD147/Basigin Limits Lupus Nephritis and Th17 Cell Differentiation in Mice by Inhibiting the Interleukin-6/STAT-3 Pathway. **Arthritis & Rheumatology**, v. 67, n. 8, p. 2185-2195, 2015.
156. MANSO, Ana Maria et al. Integrins, membrane-type matrix metalloproteinases and ADAMs: potential implications for cardiac remodeling. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 574-584, 2006.
157. MARETZKY, Thorsten et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 26, p. 9182-9187, 2005.
158. MARIEB, Erica A. et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. **Cancer research**, v. 64, n. 4, p. 1229-1232, 2004.
159. MARTÍN-FONTECHA, Alfonso et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 4, p. 615-621, 2003.
160. MCCLOY, Rachael A. et al. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, v. 13, n. 9, p. 1400-1412, 2014.

161. MEGRA, Bezawit W.; EUGENIN, Eliseo A.; BERMAN, Joan W. The Role of Shed PrPc in the Neuropathogenesis of HIV Infection. **The Journal of Immunology**, p. 1601041, 2017.
162. MEISTER, Gunter; TUSCHI, Thomas. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343, 2004.
163. MILLER, Miles A. et al. ADAM-10 and-17 regulate endometriotic cell migration via concerted ligand and receptor shedding feedback on kinase signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. E2074-E2083, 2013.
164. MOLESTINA, Robert E. et al. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. **Journal of cell science**, v. 116, n. 21, p. 4359-4371, 2003.
165. MONTOYA, Jose G. et al. Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 1, p. 176-181, 1996.
166. MORDUE, Dana G. et al. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 12, p. 1783-1792, 1999.
167. MORI, Hidetoshi et al. Transmembrane/cytoplasmic, rather than catalytic, domains of Mmp14 signal to MAPK activation and mammary branching morphogenesis via binding to integrin β 1. **Development**, v. 140, n. 2, p. 343-352, 2013.
168. MOROHASHI, Yuichi; TOMITA, Taisuke. Protein trafficking and maturation regulate intramembrane proteolysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 12, p. 2855-2861, 2013.
169. MURAMATSU, Takashi. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. **The Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 5, p. 481-490, 2015.
170. NABESHIMA, Kazuki et al. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. **Pathology international**, v. 56, n. 7, p. 359-367, 2006.
171. NAGANO, Osamu et al. Cell–matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular

- Ca²⁺ influx and PKC activation. **The Journal of cell biology**, v. 165, n. 6, p. 893-902, 2004.
172. NAKADA, Mitsutoshi et al. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 2, p. 417-428, 1999.
173. NAKAI, Masaaki; CHEN, Li; NOWAK, Romana A. Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: A study using the wild-type and basigin gene knockout mice. **The Anatomical Record**, v. 288, n. 5, p. 527-535, 2006.
174. NAM, Do-Hyun et al. Activation of notch signaling in a xenograft model of brain metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 13, p. 4059-4066, 2008.
175. NASH, Paul B. et al. Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 4, p. 1824-1830, 1998.
176. NICOLLE C, MANCEAUX L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Acad Sci 148*: 369. 1909
177. NICOLLE C, MANCEAUX L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci 147*: 736. 1908
178. NIEHUS, Sebastian et al. Glycosylphosphatidylinositols of Toxoplasma gondii induce matrix metalloproteinase-9 production and degradation of galectin-3. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 61-64, 2012.
179. NOTTET, H. S. et al. Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 3, p. 1284-1295, 1996.
180. OBERT-GANGNEUX, Florence; DARDÉ, Marie-Laure. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
181. OCHRIETOR, Judith D. et al. Inactivation of the Basigin gene impairs normal retinal development and maturation. **Vision research**, v. 42, n. 4, p. 447-453, 2002.
182. ODAERT, H., et al. "Stage conversion of Toxoplasma gondii in mouse brain during infection and immunodepression." **Parasitology research** 82.1. 28-31. 1996
183. OHUCHI, Eiko et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2446-2451, 1997.

184. ONG, Yi-Ching; REESE, Michael L.; BOOTHROYD, John C. Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28731-28740, 2010.
185. OWEN, Caroline A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 3, n. 2, p. 253, 2008.
186. PAKULA, Rachel et al. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 492-503, 2007.
187. PALUDAN, Søren R.; BOWIE, Andrew G. Immune sensing of DNA. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 870-880, 2013.
188. PAPPAS, Georgios; ROUSSOS, Nikos; FALAGAS, Matthew E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, 2009.
189. PARKIN, Edward; HARRIS, Benjamin. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-mediated ectodomain shedding of ADAM10. **Journal of neurochemistry**, v. 108, n. 6, p. 1464-1479, 2009.
190. PARKS, William C.; WILSON, Carole L.; LÓPEZ-BOADO, Yolanda S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 617-629, 2004.
191. PARRA, Liseth M. et al. Distinct intracellular domain substrate modifications selectively regulate ectodomain cleavage of NRG1 or CD44. **Molecular and cellular biology**, v. 35, n. 19, p. 3381-3395, 2015.
192. PAUL, Cynthia P. et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505-508, 2002.
193. PAYNE, Kimberly J. et al. Residency and activation of myeloid cells during remodeling of the prepartum murine cervix. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 5, 2012.
194. PERSIDSKY, Yuri et al. A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 7, p. 3499-3510, 1997.
195. PETRIE, Ryan J. et al. Activating the nuclear piston mechanism of 3D migration in tumor cells. **J Cell Biol**, v. 216, n. 1, p. 93-100, 2017.

196. PITTMAN, Kelly J.; KNOLL, Laura J. Long-term relationships: the complicated interplay between the host and the developmental stages of *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infections. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 4, p. 387-401, 2015.
197. PORTER, Sarah et al. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochemical Journal**, v. 386, n. 1, p. 15-27, 2005.
198. POTAPOVA, Tamara A. et al. Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 8, p. 1191-1206, 2011.
199. PRUESSMEYER, Jessica et al. Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space. **Blood**, v. 123, n. 26, p. 4077-4088, 2014.
200. PURBA, Endang R.; SAITA, Ei-ichiro; MARUYAMA, Ichiro N. Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model". **Cells**, v. 6, n. 2, p. 13, 2017.
201. PUSHKARSKY, Tatiana et al. CD147 stimulates HIV-1 infection in a signal-independent fashion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 363, n. 3, p. 495-499, 2007.
202. PUSHKARSKY, Tatiana et al. Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27866-27871, 2005.
203. QU, Shuo-yao et al. Notch signaling pathway regulates the growth and the expression of inflammatory cytokines in mouse basophils. **Cellular Immunology**, 2017.
204. RATHORE, Sumit et al. Basigin interacts with *Plasmodium vivax* tryptophan-rich antigen PvTRAg38 as a second erythrocyte receptor to promote parasite growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 2, p. 462-476, 2017.
205. RAUCH, Isabella; MÜLLER, Mathias; DECKER, Thomas. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. **Jak-Stat**, v. 2, n. 1, p. e23820, 2013.
206. REICHMANN, G. et al. Detection of a novel 40 000 MW excretory *Toxoplasma gondii* antigen by murine Th1 clone which induces toxoplasmacidal activity when exposed to infected macrophages. **Immunology**, v. 92, n. 2, p. 284-289, 1997.

207. ROBBINS, Jennifer R. et al. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 418-428, 2012.
208. ROBIBARO, Bruno et al. Endocytosis in different lifestyles of protozoan parasitism: role in nutrient uptake with special reference to *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1343-1353, 2001.
209. RORMAN, Efrat et al. Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458-472, 2006.
210. RYDLOVA, M. et al. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. **Anticancer research**, v. 28, n. 2B, p. 1389-1397, 2008.
211. SABEH, Farideh et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **J Cell Biol**, v. 167, n. 4, p. 769-781, 2004.
212. SAEIJ, J. P. J. et al. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 324, 2007.
213. SAEIJ, Jeroen PJ; BOYLE, Jon P.; BOOTHROYD, John C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 10, p. 476-481, 2005.
214. SAFTIG, Paul; LICHTENTHALER, Stefan F. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. **Progress in neurobiology**, v. 135, p. 1-20, 2015.
215. SAHIN, Umut et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. **The Journal of cell biology**, v. 164, n. 5, p. 769-779, 2004.
216. SAKAMOTO, Takeharu; SEIKI, Motoharu. Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity. **Genes to Cells**, v. 14, n. 5, p. 617-626, 2009.
217. SALLUSTO, Federica et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **European journal of immunology**, v. 28, n. 9, p. 2760-2769, 1998.
218. SALOWE, Scott P. et al. Characterization of zinc-binding sites in human stromelysin-1: stoichiometry of the catalytic domain and identification of a

- cysteine ligand in the proenzyme. **Biochemistry**, v. 31, n. 19, p. 4535-4540, 1992.
219. SATO, Hiroshi et al. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. **FEBS letters**, v. 393, n. 1, p. 101-104, 1996.
220. SCAMUFFA, Nathalie et al. Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 1, p. 352, 2008.
221. SCHLEGEL, J et al. Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A. **J Mol Biol.** V. 391(3), p. 518-35, 2009.
222. SCHLESINGER, L. S. Entry of Mycobacterium tuberculosis into mononuclear phagocytes. In: **Tuberculosis**. Springer Berlin Heidelberg, p. 71-96, 1996.
223. SCHLONDORFF, J.; BLOBEL, Carl P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J Cell Sci**, v. 112, n. 21, p. 3603-3617, 1999.
224. SCHNEIDERHAN, Wilhelm et al. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. **Gut**, v. 58, n. 10, p. 1391-1398, 2009.
225. SCHUINDT, Sara Hellen Santos et al. Secretion of multi-protein migratory complex induced by Toxoplasma gondii infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3, p. 207-215, 2012.
226. SCHULZ, Beate et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. **Circulation research**, v. 102, n. 10, p. 1192-1201, 2008.
227. SEABRA, Sergio H.; DE SOUZA, Wanderley; DAMATTA, Renato A. Toxoplasma gondii partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental parasitology**, v. 100, n. 1, p. 62-70, 2002.
228. SEALS, Darren F.; COURTNEIDGE, Sara A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & development**, v. 17, n. 1, p. 7-30, 2003.
229. SEFTOR, R. E. et al. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1557-1561, 1992.

230. SEIPEL, Daniele et al. Toxoplasma gondii infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. **Veterinary parasitology**, v. 169, n. 3, p. 312-319, 2010.
231. SEIZER, Peter et al. EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation. **Atherosclerosis**, v. 209, n. 1, p. 51-57, 2010.
232. SENSINI, A. IgG avidity in the serodiagnosis of acute Toxoplasma gondii infection: a multicenter study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, n. 1, p. 25-29, 1996.
233. SERBINA, Natalya V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 421-452, 2008.
234. SHEN, Bang; SIBLEY, L. David. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 4, p. 449-455, 2012.
235. SHRESTHA, Sunder P. et al. Proliferation of Toxoplasma gondii in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. **International journal for parasitology**, v. 36, n. 4, p. 433-441, 2006.
236. SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.
237. SIBLEY, L. David; AJIOKA, James W. Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 329-351, 2008.
238. SINAI, A. P. et al. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by Toxoplasma gondii. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 3, p. 381-391, 2004.
239. SOLANAS, Guiomar et al. Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. **Nature cell biology**, v. 13, n. 9, p. 1100, 2011.
240. SOZZANI, Silvano et al. Cutting edge: differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 3, p. 1083-1086, 1998.
241. SPEER, C. A., et al. "Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of Neospora caninum and Toxoplasma gondii." *International journal for parasitology* 29.10. 1509-1519. 1999

242. SPLENDORE A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo** 3: 109-112. 1908
243. STAWOWY, Philipp et al. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF- β 1 involves furin-convertase. **Cardiovascular research**, v. 63, n. 1, p. 87-97, 2004.
244. STEIN, Jens V.; NOMBELA-ARRIETA, César. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. **Immunology**, v. 116, n. 1, p. 1-12, 2005.
245. STÖCKER, Walter; BODE, Wolfram. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Current opinion in structural biology**, v. 5, n. 3, p. 383-390, 1995.
246. STRONGIN, Alex Y. Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 133-141, 2010.
247. STUMHOFER, Jason S. et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. **Nature immunology**, v. 7, n. 9, p. 937, 2006.
248. SU, Chunlei et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, 2012.
249. SUBAUSTE, Carlos S.; WESSENDARP, Matthew. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and-independent T cell production of IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1498-1505, 2000.
250. SUZUKI, Yasuhiro et al. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516, 1988.
251. SWANEY, Kristen F.; HUANG, Chuan-Hsiang; DEVREOTES, Peter N. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. **Annual review of biophysics**, v. 39, p. 265-289, 2010.
252. TAKEDA, Soichi. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: a structural overview. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 155, 2016.

253. TAKEDA, Soichi. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2009. p. 146-152.
254. TANG, Wei; CHANG, Sharon B.; HEMLER, Martin E. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 9, p. 4043-4050, 2004.
255. TARDIEUX, Isabelle; MENARD, Robert. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the Toxoplasma and Plasmodium rides. **Traffic**, v. 9, n. 5, p. 627-635, 2008.
256. THWAITES, Guy E. et al. Pathophysiology and prognosis in Vietnamese adults with tuberculous meningitis. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 8, p. 1105-1115, 2003.
257. TIAN, Li et al. EMMPRIN is an independent negative prognostic factor for patients with astrocytic glioma. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58069, 2013.
258. TILL, Andreas et al. A role for membrane-bound CD147 in NOD2-mediated recognition of bacterial cytoinvasion. **J Cell Sci**, v. 121, n. 4, p. 487-495, 2008.
259. TOOLE, Bryan P.; SLOMIANY, Mark G. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. **Drug Resistance Updates**, v. 11, n. 3, p. 110-121, 2008.
260. TORGERSON, Paul R.; MASTROIACOVO, Pierpaolo. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013.
261. TURUNEN, S. Pauliina; TATTI-BUGAEVA, Olga; LEHTI, Kaisa. Membrane-type matrix metalloproteinases as diverse effectors of cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 2017.
262. UENO, Hideki et al. Dendritic cell subsets in health and disease. **Immunological reviews**, v. 219, n. 1, p. 118-142, 2007.
263. UNNO, Akihiro et al. Dissemination of extracellular and intracellular Toxoplasma gondii tachyzoites in the blood flow. **Parasitology international**, v. 57, n. 4, p. 515-518, 2008.
264. VISSE, Robert; NAGASE, Hideaki. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Circulation research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

265. VUTOVA, Polya et al. Toxoplasma gondii inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1556-1570, 2007.
266. WANG, M. F et al. Fibronectin degradation by MMP-2/MMP-9 in the serum of pregnant women and umbilical cord with Toxoplasma gondii infection. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 33, n. 4, p. 370-374, 2013.
267. WEIDNER, Jessica M. et al. Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by Toxoplasma gondii coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 10, p. 1735-1752, 2013.
268. WEIGHT, Caroline M.; CARDING, Simon R. The protozoan pathogen Toxoplasma gondii targets the paracellular pathway to invade the intestinal epithelium. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1258, n. 1, p. 135-142, 2012.
269. WEISS, Louis M., and DUBEY Jitender P.. "Toxoplasmosis: A history of clinical observations." **International journal for parasitology** 39.8. 895-901.2009
270. WILSON, Christopher B.; REMINGTON, Jack S. Activity of human blood leukocytes against Toxoplasma gondii. **Journal of Infectious Diseases**, v. 140, n. 6, p. 890-895, 1979.
271. WITTRUP, Anders; LIEBERMAN, Judy. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. **Nature reviews. Genetics**, v. 16, n. 9, p. 543, 2015.
272. XIE, Ming et al. Functional role of EMMPRIN in the formation and mineralisation of dental matrix in mouse molars. **Journal of molecular histology**, v. 46, n. 1, p. 21-32, 2015.
273. XIN, Xiaoyan et al. CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 6, p. 32804, 2016.
274. YAMADA, Tatsuya et al. Toxoplasma gondii inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 6, p. 595-607, 2011.
275. YAMAMOTO, Masahiro et al. A single polymorphic amino acid on Toxoplasma gondii kinase ROP16 determines the direct and strain-specific

- activation of Stat3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 12, p. 2747-2760, 2009.
276. YAMAMOTO, Masahiro et al. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20101660, 2011.
277. YANA, Ikuo; WEISS, Stephen J. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 7, p. 2387-2401, 2000.
278. YANG, Won Seok et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 causes ADAM10-dependent ectodomain shedding of tumor necrosis factor receptor 1 in vascular smooth muscle cells. **Molecular pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 533-542, 2015.
279. YAROVINSKY, Felix. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109, 2014.
280. YOON, Sang-Oh et al. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 128-137, 2003.
281. YURCHENKO, V. et al. Cyclophilin–CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 160, n. 3, p. 305-317, 2010.
282. ZHAI, Yali et al. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. **Cancer Research**, v. 65, n. 15, p. 6543-6550, 2005.
283. ZHANG, Eric E. et al. A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. **Cell**, v. 139, n. 1, p. 199-210, 2009.
284. ZHAO, Guojun et al. γ -Secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1648-1656, 2010.
285. GIEBELER, Nives; ZIGRINO, Paola. A disintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions. *Toxins*, v. 8, n. 4, p. 122, 2016.
286. ZONG, JiaXin et al. CD147 induces up-regulation of vascular endothelial growth factor in U937-derived foam cells through PI3K/AKT pathway. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 609, p. 31-38, 2016.

Anexo - Certificado de aprovação do protocolo nº 292 pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – UENF)



Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 292, intitulado "BASES MOLECULARES DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO INFECTADAS POR *Toxoplasma gondii* ATRAVÉS DAS BARRERAS MUCOSAS DO HOSPEDEIRO" sob a responsabilidade da Dra. Andrea Cristina Veto Arnoldi, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/CBCEA) bem como a lei federal nº 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 15/12/2015. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 15-12/2019.

Campos dos Goytacazes, 15 de dezembro de 2015.

Clovis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Clovis de Paula Santos
Presidente CEUA/UENF