

MECANISMO DE EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO
UTILIZADO POR *TOXOPLASMA GONDII* OCORRE DE MANEIRA
CICLO CELULAR DEPENDENTE

THIAGO ALVES TEIXEIRA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2017

MECANISMO DE EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO
UTILIZADO POR *TOXOPLASMA GONDII* OCORRE DE MANEIRA
CICLO CELULAR DEPENDENTE

THIAGO ALVES TEIXEIRA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

ORIENTADOR: SERGIO HENRIQUE SEABRA

CO-ORIENTADOR: RENATO AUGUSTO DAMATTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

OUTUBRO DE 2017

MECANISMO DE EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO
UTILIZADO POR *TOXOPLASMA GONDII* OCORRE DE MANEIRA
CICLO CELULAR DEPENDENTE

THIAGO ALVES TEIXEIRA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 2 de outubro de 2017 por:

Prof. Dr. Fábio da Silva de Azevedo Fortes (Doutor em Ciências Biológicas) - UEZO

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos (Doutor em Parasitologia Veterinária) - UENF

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Doutor em Ciências Biológicas) - UENF

Orientador

“Mas pra quem tem pensamento forte,

O impossível é só questão de opinião...”

(Alexandre Magno Abrão & Thiago Castanho)

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo.

Aos meus pais e meu irmão.

Aos meus padrinhos.

Aos meus familiares.

À minha noiva.

Aos meus amigos e orientadores Sergio Seabra e Renato DaMatta.

Aos professores do CBB-UENF.

Aos amigos da UEZO, em especial Pedro Rodrigues, Felipe Figueirôa, Yago Moreira, Pedro Theófilo, Eliandro Lima, Adriano Pereira, Daniel machado, Jamila Perini, Jéssica Perini, Tatiana Guinancio e Juliana Portes.

Aos amigos da UENF, em especial Julia Rezende e Juliana Azevedo.

Às amigas da FIOCRUZ Paraná (ICC), Sheila Nardelli, Mariana Sayuri, Carolina Moraes e Vanessa Severo.

Cada um de vocês foi fundamental para conclusão desta etapa em minha vida.

Serei eternamente grato.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	viii
Resumo	ix
Abstract.....	x
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Toxoplasmose	3
2.1.1. Epidemiologia	3
2.1.2 Tratamento	4
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.2.1. Formas evolutivas de <i>T. gondii</i>	5
2.2.2. Ciclo de vida	9
2.2.3. Divisão por endodiogenia	10
2.3. Interação entre <i>T. gondii</i> e célula hospedeira	12
2.3.1. Mecanismos de invasão	12
2.3.2. Mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro.....	14
2.4. Mimetismo apoptótico: Burlando o sistema imunológico do hospedeiro	15
2.4.1. Apoptose	15
2.4.2. Apoptose-like.....	19
2.4.3. Mimetismo apoptótico	19
3. Justificativa	24
4. Objetivos.....	25
4.1. Objetivo geral.....	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. Materiais e métodos	26
5.1. Células LLC-MK2.....	26
5.2. Taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
5.3. Isolamento das subpopulações PS + e PS-	26
5.4. Determinação do estágio de ciclo celular das subpopulações de parasitas por citometria de fluxo.....	27
5.5. Análise por citometria de fluxo da variação da exposição de PS em <i>T. gondii</i> em diferentes tempos pós-infecção.	27
5.6. Quantificação do material genético presente nas subpopulações isoladas de <i>T. gondii</i> por espectrofotometria	27
5.7. Análise por bioinformática e eleição da flipase para o estudo	27

5.8. Avaliação da expressão de flipase nas subpopulações isoladas de <i>T. gondii</i>	28
5.9. Microscopia eletrônica de varredura	28
5.10. Análise da influência da resposta imunológica do hospedeiro na exposição de PS por <i>T. gondii</i>	28
5.11. Construção de <i>T. gondii</i> com sequência de flipase (tg_224190) adicionada a um tag HA.....	29
5.12. Análise por imunofluorescência da localização da flipase (tg_224190) em <i>T. gondii</i>	30
6. Resultados	31
6.1. Análise por citometria de fluxo do tamanho e complexidade interna das subpopulações PS+ e PS- de <i>T. gondii</i>	31
6.2. Determinação do estágio de ciclo celular das subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
6.3. Quantificação de DNA das subpopulações isoladas de <i>Toxoplasma gondii</i>	33
6.4. Análise da exposição de PS em diferentes estádios do ciclo celular das subpopulações isoladas de <i>Toxoplasma gondii</i> durante interação com células LLC-MK2.	34
6.5. Análise do mecanismo de invasão da subpopulação PS- de <i>T. gondii</i> durante interação com macrófagos peritoneais de camundongos.	35
6.6. Análise da relação entre a resposta imunológica do hospedeiro e a exposição de PS por taquizoítas de <i>T. gondii</i>	36
6.7. Localização da flipase com papel fundamental para translocação de PS em <i>T. gondii</i>	37
6.8. Análise da expressão da flipase TGME49_224190 nas subpopulações PS+ e PS- de taquizoítas de <i>T. gondii</i>	38
6.9. Análise da localização da flipase TGME49_224190 em taquizoítas de <i>T. gondii</i> mutantes.....	39
7. Discussão	40
8. Conclusão	44
9. Referências Bibliográficas	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da forma taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 2. Estádio bradizoíta de <i>T. gondii</i>	7
Figura 3. Estádio esporozoíta de <i>T. gondii</i>	8
Figura 4: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Figura 5: Fases do ciclo celular durante a divisão por endodiogenia em <i>Toxoplasma gondii</i>	11
Figura 6: Mecanismos de invasão do <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Figura 7: Processo de apoptose	16
Figura 8. Vias de ativação do processo de apoptose.	18
Figura 9. Apoptose X Mimetismo apoptótico.	21
Figura 10: Determinação do estágio de ciclo celular das subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i> por citometria de fluxo.	32
Figura 11. Análise quantitativa do DNA das subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i> por espectrofotometria.	33
Figura 12: <i>Toxoplasma gondii</i> PS+ são menores em tamanho e complexidade interna quando comparados aos PS-.	31
Figura 13. Análise da exposição de PS em diferentes estádios do ciclo celular das subpopulações isoladas de <i>Toxoplasma gondii</i> durante interação com células LLC-MK2.	34
Figura14: Macrófago fagocitando parasita PS-.	35
Figura 15: Relação entre a resposta imunológica do hospedeiro e a exposição de PS por <i>T. gondii</i>	36
Figura 16: Perfis de expressão da flipase TGME49_224190.	37
Figura 17: Expressão de mRNA de flipase nas subpopulações isoladas e na população total de <i>T. gondii</i> por RT-PCR e eletroforese em gel.	38
Figura 18: Imunofluorescência para localização de flipase (Tg_224190) em <i>T. gondii</i>	39

RESUMO

Células em processo de apoptose são capazes de translocar, através de flipases, fosfatidilserina (PS) do meio intracelular para o meio extracelular, inibindo, assim, a resposta inflamatória do organismo. Este mecanismo também tem sido relacionado à mecanismos de evasão de parasitos protozoários, conceito conhecido como “mimetismo apoptótico”. Nosso grupo descreveu a importância de ambas as subpopulações de parasitas - a que expõe PS em sua membrana plasmática (PS+), e a que não expõe (PS-) - para o sucesso da infecção. Além disso, demonstramos que parasitas PS+ invadem células ativamente, enquanto parasitas PS- dependem da atividade endocítica da célula hospedeira. No entanto, não haviam informações quanto à origem dessas subpopulações de parasitas. O objetivo deste trabalho foi elucidar a origem das subpopulações PS+ e PS- de *T. gondii*, buscando compreender os fatores determinantes para a exposição de PS. Por citometria de fluxo, microscopia eletrônica de varredura, e espectrofotometria, pudemos concluir que a exposição de PS em *T. gondii* possui relação com o ciclo celular do parasita. Para análise do mecanismo utilizado pelo parasita para expor PS, verificamos a expressão gênica da flippase com maior homologia com a flippase de humanos. Esta flippase é responsável pela translocação de PS da face externa para a face interna da membrana plasmática. Os resultados demonstraram que parasitas PS+ expressam menos flippase, em comparação à expressão apresentada em parasitas PS-. Em seguida, uma sequência detectável por anticorpos foi adicionada à sequência dessa flippase em *T. gondii* e, assim, foram criados parasitas mutantes. Por microscopia de fluorescência, observa-se que diferentes perfis de distribuição de flippase são encontrados de acordo com a fase de divisão do parasita. Assim, nossos resultados demonstraram que o mimetismo apoptótico em *T. gondii* é dependente do ciclo celular do parasita, e que a internalização de PS na membrana pode ocorrer através de flipases.

Palavras-chave: *Toxoplasma*; Fosfatidilserina; Mimetismo apoptótico

ABSTRACT

Apoptotic cells are able to translocate, through flippases, phosphatidylserine (PS) from the intracellular medium into the extracellular medium, thereby inhibiting the body's inflammatory response. This mechanism has been related to the mechanisms of evasion of protozoan parasites, a concept known as "apoptotic mimicry". Our group described the importance of both subpopulations of parasites - the one that exposes PS on its plasma membrane (PS +), and the one that does not expose (PS-) - to the success of the infection. In addition, we have demonstrated that PS + parasites invade cells actively, whereas PS- parasites depend on the endocytic activity of the host cell. However, there was no information as to the origin of these subpopulations of parasites. The purpose of this work was to elucidate the origin of the PS + and PS- subpopulations of *T. gondii*, seeking to understand the determinant factors for PS exposure. By flow cytometry, scanning electron microscopy, and spectrophotometry, we could conclude that PS exposure in *T. gondii* is related to the cell cycle of the parasite. For analysis of the mechanism used by the parasite to expose PS, we verified the gene expression of flippase with greater homology with flippase from humans. This flippase is responsible for the translocation of PS from the outer face to the inner face of the plasma membrane. The results showed that PS+ parasites express less flippase, compared to the expression presented in PS- parasites. Thereafter, an antibody-detectable sequence was added to the sequence of that flippase in *T. gondii* and, thus, mutant parasites were created. By fluorescence microscopy, we observed that different profiles of flippase distribution are found according to the phase of division of the parasite. Thus, our results demonstrated that apoptotic mimicry in *T. gondii* is dependent on the cell cycle of the parasite, and that the internalization of PS in the membrane can occur through flippases.

Keywords: *Toxoplasma*; Phosphatidylserine; Apoptotic mimicry

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, doença que afeta cerca de um terço da população mundial, onde os grupos de risco incluem desde indivíduos imunocomprometidos até animais de importância econômica (Lyons e Johnson, 1995; Sibley *et al.*, 2010). Este parasita é considerado um dos mais bem adaptados do planeta, pois é capaz de infectar praticamente todos os animais de sangue quente (Tenter *et al.*, 2000; Carruthers, 2002). Esta adaptação se dá, principalmente, devido a sua capacidade de evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro através de diferentes mecanismos (Carruthers, 2002; De Souza *et al.*, 2010). Dentre estes mecanismos, o mimetismo apoptótico possui fundamental importância para o sucesso da infecção (Santos *et al.*, 2011).

Durante o processo de mimetismo apoptótico, o parasita burla a atividade microbicida do organismo através da exposição de fosfatidilserina (PS) no ambiente extracelular (Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011). A fosfatidilserina é um fosfolípido de membrana que, dentre outras funções, participa da sinalização em células que entram em apoptose (Frey e Gaipf, 2011). Em células apoptóticas, a PS é translocada da face intracelular para a face extracelular da membrana plasmática através de proteínas transmembrana denominadas flipase (Clark, 2011). Esta PS exposta é, então, reconhecida por células efectoras do organismo, que disparam uma sinalização anti-inflamatória e, assim, a célula é digerida silenciosamente (Clark, 2011; Birge *et al.*, 2016). O mimetismo apoptótico foi descrito em diferentes parasitas além de *T. gondii*, como *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (de Freitas Balanco *et al.*, 2001; DaMatta *et al.*, 2007; Wanderley *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo utilizado para exposição de PS e desempenho do mimetismo apoptótico não foi descrito até então.

Taquizoítas de *T. gondii* em diferentes fases do seu ciclo celular comportam-se de maneiras distintas quanto ao processo de invasão: parasitas na fase G1 são mais invasivos, quando comparados à parasitas nas fases S e M/C do ciclo (Gaji *et al.*, 2010). Isso se dá através de alterações na expressão gênica do parasita. Essas diferenças no processo de invasão assemelham-se ao resultado publicado pelo nosso grupo (Santos *et al.*, 2011), onde demonstramos que a subpopulação de *T. gondii* que expõe PS (PS+) é mais invasiva que a subpopulação que não expõe PS (PS). Assim, há de se pensar na possibilidade do ciclo celular do parasita estar relacionado à

exposição de PS. Neste sentido, o presente estudo investigou a origem das subpopulações PS+ e PS- em taquizoítas de *T. gondii* e a sua relação com as diferentes fases do ciclo celular do parasita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasita *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Em 2004, Montoya e Liesenfeld estimaram que cerca de um terço da população mundial é soropositiva para *T. gondii*. No entanto, a infecção só evolui para a fase aguda em indivíduos que sofrem distúrbios imunológicos, fazendo com que, na maioria das vezes, a infecção primária pelo parasita ocorra de forma assintomática (Wong e Remington, 1994).

Basicamente, a infecção por *T. gondii* pode ocorrer de forma congênita ou adquirida. A toxoplasmose congênita se dá quando a infecção primária ocorre durante o período gestacional, pois o parasita possui capacidade de atravessar a placenta e alcançar o feto (Weiss e Kim, 2007; 2013). A toxoplasmose adquirida caracteriza-se pela infecção do indivíduo através da ingestão de alimentos ou água contaminados por *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por *T. gondii* ocorre de forma assintomática, pois o hospedeiro desenvolve resposta imunológica contra o parasita. A atividade imunológica do indivíduo infectado pode inibir a evolução da infecção para a doença, originando a fase crônica, onde o parasita diferencia-se para uma forma de reprodução lenta. Em casos de imunodepressão, o parasita volta a desenvolver-se normalmente, desencadeando a fase aguda da infecção, podendo causar diversos danos como retinocoroidites, encefalites e lesões no sistema nervoso central (Ambroise-Thomas e Pelloux, 1993; Ferguson, 2009).

2.1.1. Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a toxoplasmose se enquadra na categoria de doenças causadas por microorganismos patogênicos. Em 2012, esta categoria de enfermidades foi responsável por cerca de 9,5 milhões de mortes humanas, correspondendo à 17% da mortalidade humana mundial (WHO, 2012). Este fato pode estar associado ao potencial adaptativo desses microorganismos.

Toxoplasma gondii é capaz de infectar praticamente todos os animais homeotérmicos (Lyons e Johnson, 1995; Tenter *et al.*, 2000; Carruthers *et al.*, 2002;

Sibley *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). De acordo com Pappas e colaboradores (2009), a prevalência sorológica da doença varia entre 10% e 90% de acordo com a região estudada. No mundo inteiro, a infecção de mulheres pelo parasita varia desde 10.9% (Noruega) até 90% ou mais (na França e Taiti) e no Brasil, em Fortaleza (Ceará), cerca de 71% das gestantes apresentam soropositividade para a toxoplasmose (Pappas *et al.*, 2009). Esse é um dado epidemiológico importante quando se considera o risco de transmissão da doença ao feto, que é extremamente alto se a infecção ocorre até a vigésima quarta semana de gestação, sendo maior quanto mais cedo o feto for infectado (Milewska-Bobula *et al.*, 2015).

No sul do Brasil há grande prevalência sorológica para *T. gondii*, em torno de 80%, sendo a principal rota de infecção o consumo de carne suína, levando ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular em parte da população infectada (Jones *et al.*, 2006).

Em Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, a prevalência sorológica para *T. gondii* chegou a atingir 84%, devido a ocorrência de um surto ocasionado por contaminação com oocistos de reservatórios de água (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

2.1.2 Tratamento

O tratamento de pacientes com toxoplasmose na fase aguda é realizado, na maioria dos casos, através da administração de fármacos antifolato, onde o mais comum é a associação entre sulfadiazina e pirimetamida. No entanto, o emprego desses fármacos está relacionado com efeitos colaterais, como a supressão medular. Desta forma, é importante o uso concomitante de ácido fólico, a fim de reduzir efeitos hematológicos indesejados durante o tratamento (Frenkel *et al.*, 1960; Haverkos, 1987). O tratamento de gestantes é baseado no emprego de espiramicina, um antibiótico ativo contra a forma taquizoíta do parasito (Garin *et al.*, 1968; Niel e Videau, 1981). Em pacientes intolerantes à sulfa, o tratamento é realizado com a administração de clindamicina, um antibiótico, associado à pirimetamina (Montoya & Liensfeld, 2004).

2.2. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae (Montoya & Liensiefeld, 2004). Foi descrito primeiramente no Brasil por Splendore (1908) em coelho e por Nicolle e Manceaux (1908) no Norte da África em um roedor (*Ctenodactylus gundi*). Trata-se de um protozoário parasítico intracelular obrigatório de distribuição mundial, considerado um dos mais bem-sucedidos do planeta, sendo capaz de infectar grande variedade de vertebrados homeotérmicos, incluindo seres humanos e animais de importância econômica (Lyons e Johnson, 1995; Tenter *et al.*, 2000; Carruthers *et al.*, 2002; Sibley *et al.*, 2010).

2.2.1. Formas evolutivas de *T. gondii*

Durante seu ciclo de vida, *T. gondii* pode apresentar diferentes estádios evolutivos, como descrito a seguir:

Taquizoíta

Este estágio evolutivo de *T. gondii* é assim denominado devido a capacidade dos parasitas de multiplicarem-se rapidamente, por endodiogenia. É característico da fase aguda da toxoplasmose e desenvolve-se no interior da célula hospedeira, dentro do vacúolo parasitóforo formado no momento da invasão celular.

A forma taquizoíta de *T. gondii* (Figura 1) mede, aproximadamente, 2 µm de largura e 8 µm de comprimento, mas, no entanto, o tamanho pode variar de acordo com a fase do ciclo celular em que o parasita se encontra. Quanto às principais características morfológicas que o diferem das demais formas do parasita, apresenta núcleo localizado na região central do corpo e poucos grânulos de amilopectina (De Souza *et al.*, 2010).

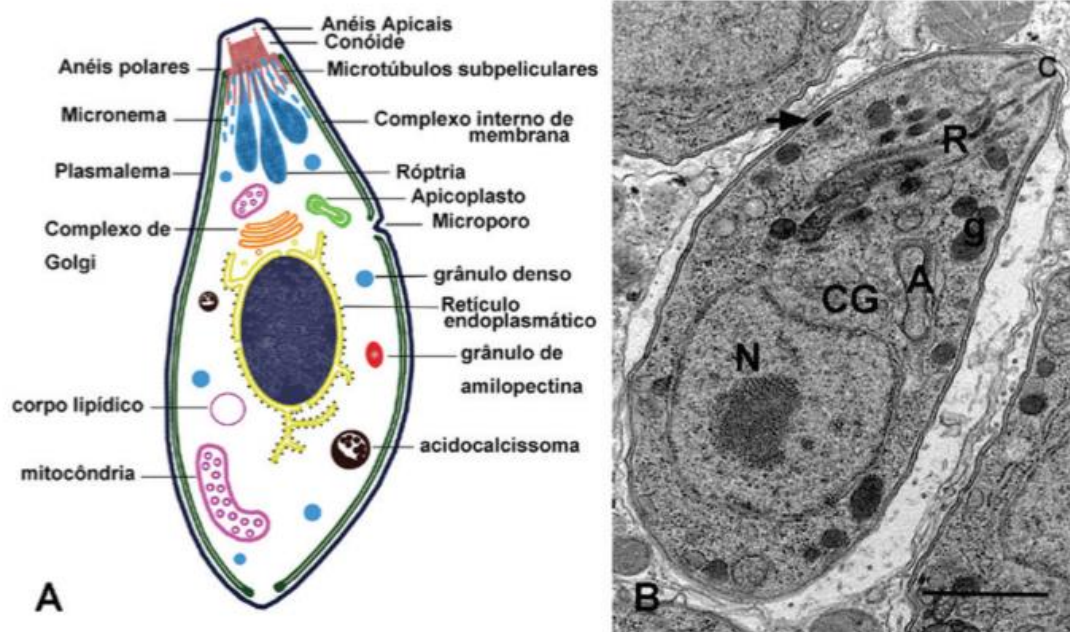


Figura 1. Morfologia da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. (A) Esquema representativo ilustrando a morfologia da forma taquizoíta. (B) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão do parasita dentro do vacúolo parasitóforo. N - núcleo, c - conóide, R - róptrias, A - Apicoplasto, g- grânulo denso, CG - Complexo de Golgi, seta – micronema. Barra: 1 μ m (retirado De Souza e cols., 2010).

Bradizoíta

O estágio bradizoíta de *T. gondii* (Figura 2) é assim denominado devido ao lento processo de divisão do parasita (por endodiogenia) enquanto encontra-se nesta forma. Sua morfologia é similar à do taquizoíta diferindo, principalmente, quanto a localização do núcleo (parte posterior do corpo do parasita) e ao maior número de micronemas e de grânulos de amilopectina. Neste estágio, o parasita mede, em média, 7 μm de comprimento por 1,5 μm de largura (Weiss e Kim, 2000).

Bradizoítas de *T.gondii* (Figura 2) desenvolvem-se no interior de cistos teciduais. Estes cistos são encontrados em diferentes tecidos, (principalmente muscular, nervoso e cardíaco), localizam-se na membrana plasmática da célula infectada e possuem paredes finas e elásticas, que são compostas por materiais oriundos do parasita e da célula hospedeira. Seu tamanho aumenta de acordo com o número de parasitas em seu interior, podendo chegar à cerca de 200 μm . O formato pode variar de acordo com o tipo celular infectado: cistos teciduais encontrados em cérebros apresentam formato arredondado, enquanto cistos encontrados em células musculares apresentam formato mais alongado (Dubey *et al.*, 1998; Weiss e Kim, 2013).

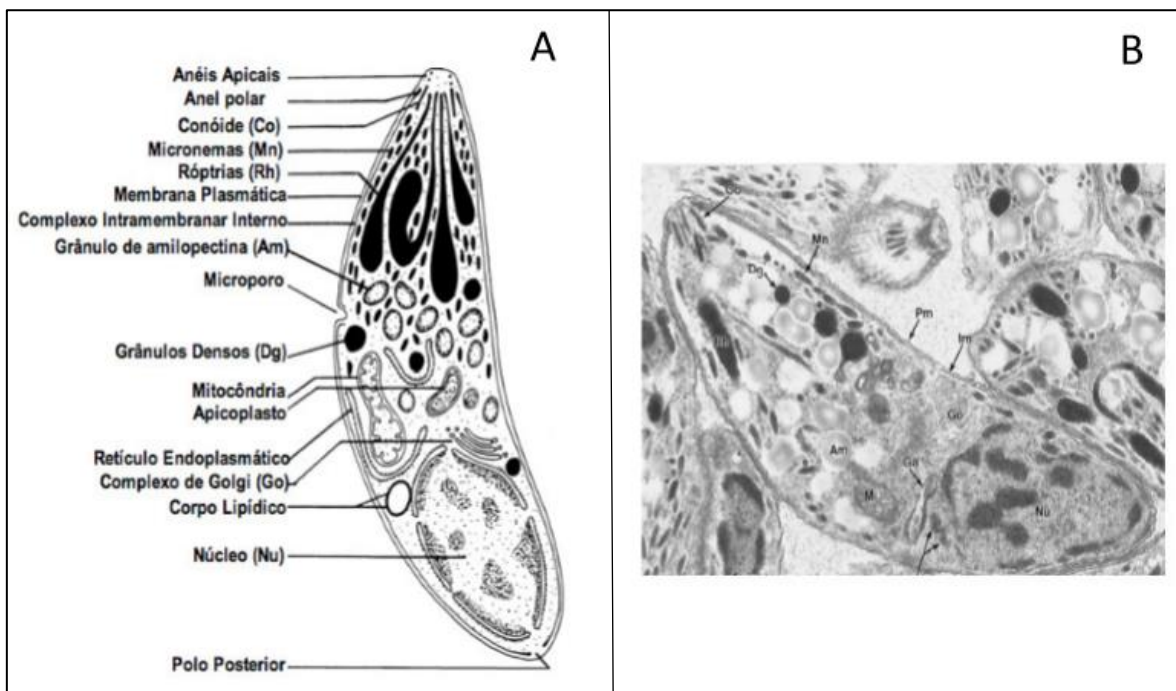


Figura 2. Estádio bradizoíta de *T. gondii*. (A) Desenho esquemático ilustrando a morfologia da forma bradizoíta. (B) Imagem correspondente por microscopia eletrônica de transmissão (Adaptado de Dubey *et al.*, 1998).

Esporozoíta

Os parasitas neste estágio evolutivo encontram-se no interior de oocistos esporulados, que são liberados no ambiente juntamente com as fezes de membros da família *felidae*. Cada esporocisto comporta quatro esporozoítas. Esporozoítas (Figura 3) medem cerca de 6 μm de largura e 8 μm de comprimento, possuem maior número de róptrias, micronemas e grânulos de amilopectina, quando comparados aos taquizoítas e bradizoítas (Dubey et al., 1998).

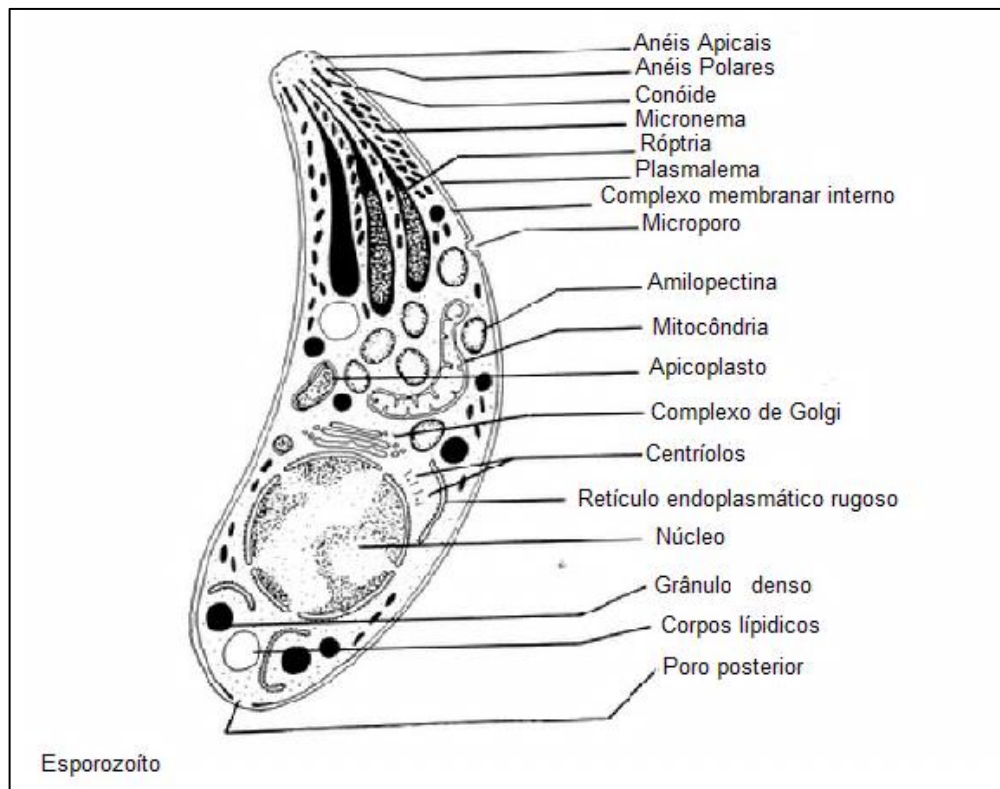


Figura 3. Estádio esporozoíta de *T. gondii*. Ilustração demonstrando a ultraestrutura da forma esporozoíta (Adaptado de Dubey et al., 1998).

2.2.2. Ciclo de vida

Toxoplasma gondii tem como hospedeiros definitivos membros da família *felidae* e como hospedeiros intermediários outros animais homeotérmicos durante seu ciclo de vida (Figura 4) (Frenkel, 1973; Blader e Saeij, 2009; Sibley *et al.*, 2010). A infecção origina-se principalmente por via oral, através da ingestão de água e vegetais contendo oocistos ou carne malcozida contaminada por cistos teciduais (Wong e Remington, 1993). Após a ingestão, ocorre o rompimento da parede externa dos cistos teciduais e dos oocistos, liberando, assim, as formas infectantes bradizoítas ou esporozoítas, respectivamente, no intestino do hospedeiro. Os parasitos liberados infectam enterócitos e se diferenciam em uma forma de multiplicação rápida, o taquizoíta, que se multiplica assexuadamente por endodiogenia (Frenkel, 1973; Blader e Saeij, 2009; Sibley *et al.*, 2010). Os taquizoítas são liberados na corrente sanguínea após o rompimento da membrana da célula hospedeira, ou são carreados por células CD11b ou CD11c positivas (Courret *et al.*, 2006) possibilitando, assim, disseminação do parasita para outros tecidos. Esta infecção inicial caracteriza a fase aguda da doença.

Quando o sistema imunológico do hospedeiro começa a atuar sobre os taquizoítas, o parasito sofre nova diferenciação em bradizoíta, que é uma forma de desenvolvimento lenta, formando cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da infecção (Frenkel, 1973; Blader e Saeij, 2009; Sibley *et al.*, 2010). Em membros da família *felidae*, após a ingestão de alimentos contendo cistos teciduais ou oocistos, os bradizoítas ou esporozoitos liberados no intestino infectam os enterócitos, multiplicam-se por uma série de esquizogonias e diferenciam-se em gametas masculinos e femininos. A fusão desses gametas resulta na formação de um zigoto diplóide (oocisto) não esporulado. O oocisto é liberado no ambiente através das fezes do animal, esporula formando dois esporocistos contendo quatro esporozoítas cada. Portanto, cada oocisto origina oito progênies haploides, os esporozoítas (Wong e Remington, 1993; Sibley *et al.*, 2010). *Toxoplasma gondii* também pode ser transmitido pela via transplacentária ao feto durante a infecção aguda de fêmeas no período de gestação (Dubey 1977; Weiss e Kim, 2007; Blader e Saeij, 2009) (Figura 4).

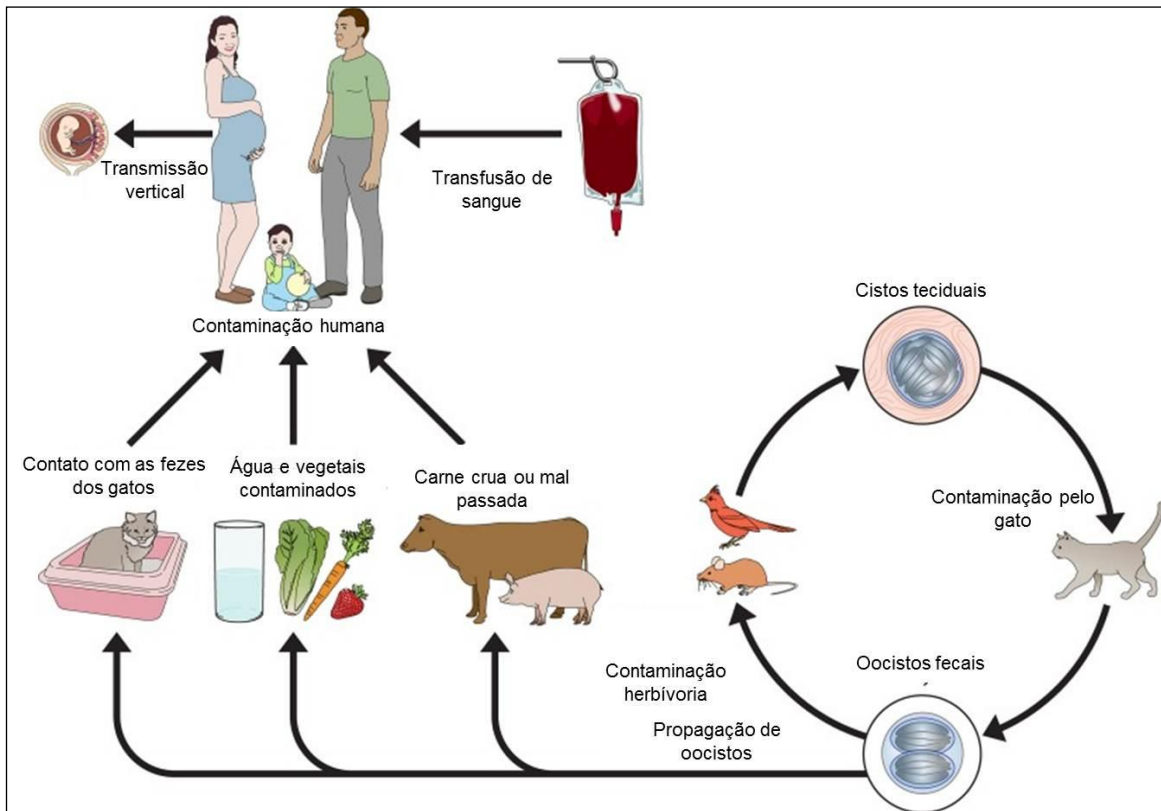


Figura 4: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose congênita ocorre quando a fêmea se contamina ainda no período gestacional. A Toxoplasmose adquirida ocorre quando animais homeotérmicos ingerem alimentos ou água contaminados por oocistos ou cistos teciduais. Há também a possibilidade de contaminação através da transfusão de sangue e transplantes de órgãos. O ciclo sexual do parasita ocorre somente em felinos, que eliminam oocistos juntamente com as fezes. Esses oocistos no ambiente podem infectar diversos animais homeotérmicos. Traduzido de Esch e Petersen (2013).

2.2.3. Divisão por endodiogenia

A replicação por endodiogenia é uma forma de reprodução assexuada, na qual duas células-filhas são formadas no interior da célula-mãe que lisa ao final do processo liberando as células-filhas. Esta forma de divisão ocorre durante a formação de taquizoítas e bradizoítas de *T. gondii*. O ciclo celular do parasito durante a endodiogenia é relativamente simples (Figura 5), possuindo apenas quatro fases facilmente detectadas por marcadores específicos: G1, S, M e C. O início da fase G1 é marcado pela replicação do complexo de Golgi, seguido da translocação do centróssomo da parte anterior para a posterior do núcleo. A fase S é iniciada com a duplicação do centróssomo, coincidindo com o início da duplicação do material

genético. Na fase M ocorre a formação de dois novos complexos apicais rudimentares, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo interno de membrana, definindo, assim, as células-filhas dentro da célula-mãe. Progressivamente, na fase C, o núcleo termina o processo de replicação e as células-filhas estendem-se, consumindo toda a célula-mãe, dando origem a dois novos parasitos (Gaji *et al.*, 2010).

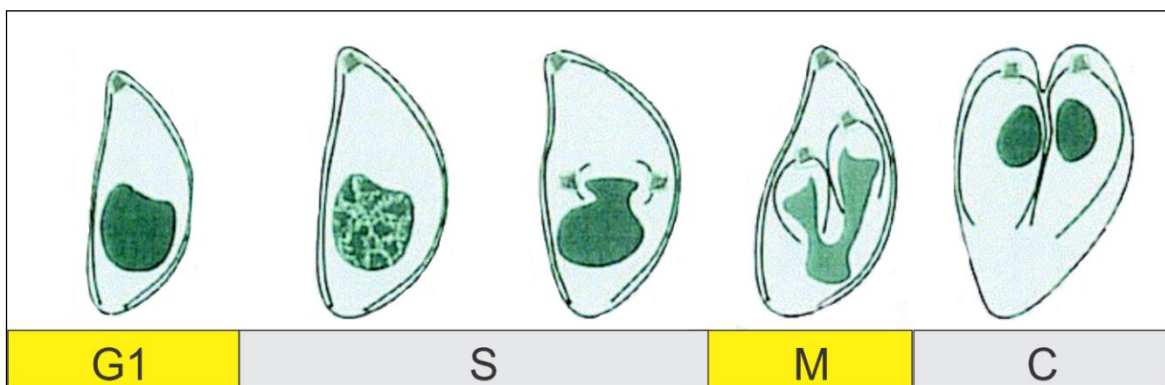


Figura 5: Fases do ciclo celular durante a divisão por endodiogenia em *Toxoplasma gondii*. Fase G1: início do processo de replicação. Fase S: duplicação do material genético e do centrosomo. Fase M: formação de complexos apicais rudimentares. Fase C: citocinese (Adaptado de Radke *et al.*, 2001).

Gaji e cols. (2010) demonstraram que taquizoítas de *T. gondii* invadem e egressam de células hospedeiras, preferencialmente, na fase G1 do ciclo celular do parasito. Este fato se dá pelo controle de sua expressão gênica. Na fase G1, genes responsáveis pela invasão, egresso e resistência ao ambiente extracelular são mais expressos que nas outras fases. Já nas fases S e M/C, os parasitos mostraram-se menos invasivos que na fase G1, visto que nestas fases a demanda de energia está voltada para o processo de divisão.

2.3. Interação entre *T. gondii* e célula hospedeira

2.3.1. Mecanismos de invasão

Toxoplasma gondii possui duas formas distintas de invadir células, as quais resultam em respostas imunológicas diferenciadas do hospedeiro. São elas penetração ativa e fagocitose. Na penetração ativa (Figura 6, lado esquerdo), a invasão é gerida pelo próprio parasita (Morisaki *et al.*, 1995). Organelas secretórias presentes em *T. gondii*, como róptrias, micronemas e grânulos densos são fundamentais para que esta invasão ocorra (Dubremetz *et al.*, 1998; Carruthers & Sibley, 1997). O processo inicia-se com a adesão de *T. gondii* à membrana da célula alvo, momento no qual ocorre a secreção de MICs, proteínas provenientes do micronema que se ligam à célula hospedeira (Dubremetz *et al.*, 1998; Brossier *et al.*, 2003). A polimerização de filamentos de actina na parte apical do parasito é responsável pela translocação de adesinas, como a MIC2, ligadas a célula hospedeira. Esta polimerização serve como substrato para a ligação de moléculas de miosina conectadas ao complexo interno de membrana do parasita (Sibley, 2003). A motilidade de *T. gondii* durante a invasão ocorre através da aldolase, enzima ligada a via glicolítica, que dispara a polimerização local da actina e atua na ligação entre a MIC2 e o citoesqueleto do parasita, gerando, assim, a mobilidade necessária para que o parasito invada a célula hospedeira (Sibley, 2003).

Para que ocorra a invasão, a membrana da célula hospedeira invagina-se, no ponto de contato com o parasita, originando a estrutura denominada junção móvel. Esta junção é composta por proteínas provenientes das róptrias (RONs 2, 4, 5 e 8) e dos micronemas (AMA1). Ao atravessar esta região, o parasito sofre uma constrição, suportada pelo seu citoesqueleto (Santos *et al.*, 2009).

Com o progresso da invasão é formado um vacúolo rente ao corpo do parasito, denominado vacúolo parasitóforo. Este vacúolo possui composição membranar diferenciada, tornando-se não-fusogênico ao sistema endomembranar da célula hospedeira. Esta característica é essencial para a sobrevivência de *T. gondii*, visto que as enzimas lisossomais da célula hospedeira não chegam no parasito (Jones & Hirsh, 1972; Sibley *et al.*, 1985; Mordue *et al.*, 1999).

A membrana do vacúolo parasitóforo é formada por componentes oriundos tanto do parasita quanto da célula hospedeira. Esta membrana possui a capacidade de selecionar a passagem de nutrientes da célula hospedeira para o interior do

vacúolo, funcionando como uma “peneira molecular”, permitindo, assim, a nutrição do parasito durante seu desenvolvimento. Isto se dá através de poros localizados na membrana do vacúolo, que permitem a passagem de solutos de baixo peso molecular. Esses poros são oriundos da associação de proteínas presentes no vacúolo parasitóforo (Schwab *et al.*, 1994).

Uma rede tubulovesicular interliga a membrana do parasito e a membrana do vacúolo parasitóforo (Mercier *et al.*, 2002; De Souza e Attias, 2015) e funciona como uma via de transporte de moléculas entre a célula hospedeira e *T. gondii*. Esta conexão é importante para a nutrição do parasito durante seu ciclo celular (Magno *et al.*, 2005). A estabilidade estrutural da rede túbulo vesicular é dada por proteínas provenientes dos grânulos densos, entre outras (Mercier *et al.*, 2005; De Souza e Attias, 2015).

A proteína ROP2, secretada pelo parasito e presente na membrana do vacúolo parasitóforo, tem sua cauda N-terminal exposta através da membrana do vacúolo, inserindo-se na membrana externa da mitocôndria da célula hospedeira. Esta associação vacúolo-mitocôndria disponibiliza fonte extra de energia para o desenvolvimento do parasito no interior do vacúolo (Beckers *et al.*, 1994).

Toxoplasma gondii é capaz, ainda, de entrar em células hospedeiras através do mecanismo fagocítico (Figura 6, lado direito). A invasão de patógenos por fagocitose foi descrita para diversos patógenos intracelulares, como protozoários, vírus e bactérias (Finlay & Cossart, 1997; Antoine *et al.*, 1998, Sibley & Andrews, 2000). Neste processo, *T. gondii* é interiorizado pela célula hospedeira sem que haja reorientação do parasito, diferentemente do que ocorre durante a invasão por penetração ativa, na qual o parasito reorienta-se e sua parte apical entra em contato com a membrana da célula hospedeira, formando, posteriormente, a junção móvel (Sibley, 1998). Na entrada por fagocitose não ocorre a secreção de proteínas pelo parasito (Morisaki *et al.*, 1995). Após a ingestão, forma-se um vacúolo largo ao redor do parasito. Este vacúolo se converte em fagossomo ao qual, posteriormente, fundem-se lisossomos, que liberam diversas enzimas hidrolíticas capazes de destruir o parasito (Sibley *et al.*, 1985; Morisaki *et al.*, 1995, Mordue & Sibley, 1997; De Souza e Attias, 2015).

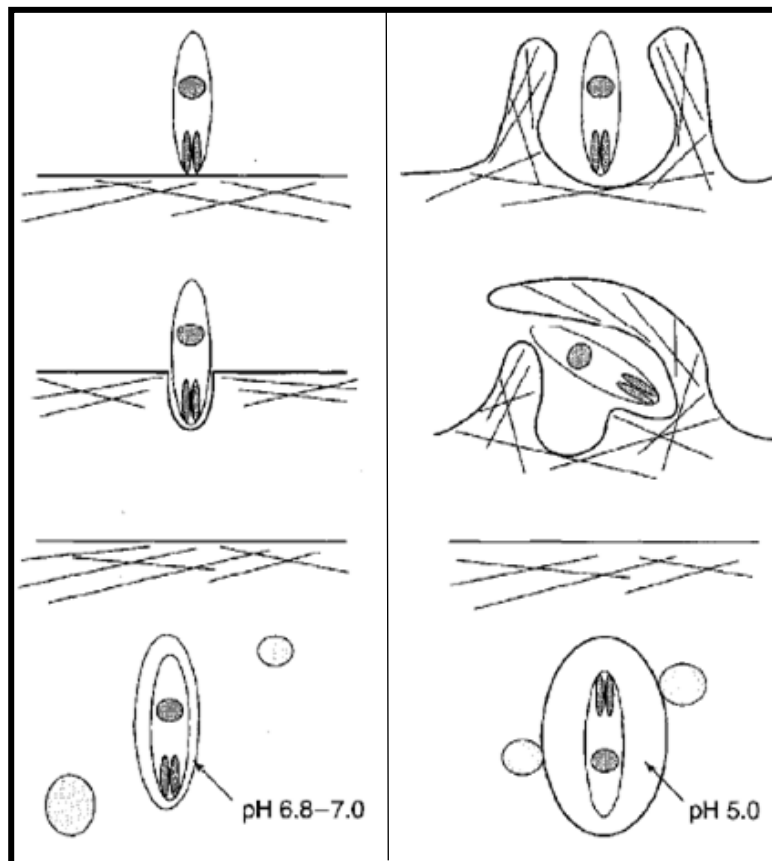


Figura 6: Mecanismos de invasão do *Toxoplasma gondii*. Na invasão por penetração ativa (esquerda), o parasita entra em contato com a célula através de sua parte apical e ocorre a invaginação da membrana da célula hospedeira, originando o vacúolo parasitóforo não-fusogênico rente ao corpo do parasita e com pH entre 6,8 e 7,0. Durante a invasão por mecanismo endocítico (direita), não ocorre reorientação do parasita, que é fagocitado. Neste processo, ocorre a formação de vacúolo endocítico largo, ao qual fundem-se lisossomos (círculos), tornando seu pH ácido (5,0) (Sibley, 1998).

2.3.2. Mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro

Toxoplasma gondii é parasita intracelular obrigatório e a resposta imunológica contra a infecção, em indivíduos imunocompetentes, é mediada por células, principalmente. Com isso, o desenvolvimento de diferentes mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro torna-se fundamental para o sucesso da infecção. Um deles consiste no tempo de invasão da célula hospedeira, que acontece em menos de 30 segundos (Sibley e Andrews, 2000). Este tempo de invasão reduzido é fundamental para impedir a ação de anticorpos e de proteínas do complemento. Outro fator que torna a infecção por *T. gondii* ainda mais complexa é a possibilidade de contaminação com diversas cepas do parasita, as quais possuem virulência

variável (Denkers e Gazzinelli, 1998). A capacidade de se diferenciar de acordo com a imunidade do hospedeiro é crucial para o sucesso da infecção e sobrevivência do parasita.

A sinalização desencadeada pela produção de IL-12 é fundamental na resistência contra patógenos intracelulares (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Macrófagos infectados por *T. gondii* são incapacitados de secretar IL-12, uma interleucina fundamental na sinalização que induz a diferenciação de células T em Th1 (Seabra *et al.*, 2002; 2004). Além disso, estudos demonstraram que *T. gondii* é capaz de afetar a ativação da sinalização via NF- κ B em macrófagos (Seabra *et al.*, 2002; 2004). A sinalização dependente dessa proteína inclui a codificação de IFN- γ , IL-12, iNOS e TNF- α (Sacks e Noben-Trauth, 2002; Seabra *et al.*, 2004).

Outra forma de inibir a atividade imunológica do hospedeiro ocorre através da exposição de Fosfatidilserina (PS) pelo parasita (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Dos Santos *et al.*, 2011). Através deste mecanismo, *T. gondii* simula uma célula em processo de apoptose, desativa a atividade microbida do hospedeiro e possibilita o prosseguimento da infecção. Este artifício denominado mimetismo apoptótico é utilizado por diferentes parasitas protozoários e será descrito a seguir.

2.4. Mimetismo apoptótico: Burlando o sistema imunológico do hospedeiro

2.4.1. Apoptose

Organismos multicelulares utilizam a apoptose como principal mecanismo para eliminar células danificadas, infectadas ou desnecessárias ao organismo (Li, 1992; Fesus, 1993; Mangahas & Zhou, 2005). A apoptose pode ocorrer por diferentes estímulos, tais como moléculas de ligação em receptores de membrana específicos, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (Hengartner, 2000).

Apoptose é um mecanismo fisiológico essencial que possui papel importante no desenvolvimento e homeostasia dos tecidos (Kerr *et al.*, 1972). Neste processo, são observadas várias alterações bioquímicas e morfológicas, incluindo o surgimento de *blebs* de membrana, condensação de cromatina e fragmentação nuclear (Kerr *et*

al., 1972) (Figura 7). Outras alterações podem ser observadas, como clivagem proteolítica de substratos intracelulares e exposição de PS na membrana plasmática da célula apoptótica (Martin *et al.*, 1995). A externalização de PS por células apoptóticas ocorre através do aumento de Ca^{2+} citosólico, promovendo a inibição ou clivagem de flipases, enzimas responsáveis pela internalização de PS, e a ativação de scramblases, enzimas capazes de externalizar PS (Clark, 2011; Segawa *et al.*, 2014; Bevers & Willianson, 2016). Essa exposição de PS sinaliza a fagocitose de células por macrófagos ou células vizinhas (Fadok *et al.*, 2001; Segawa *et al.*, 2014). Este mecanismo resulta não só na absorção da célula apoptótica, mas também induz um sinal anti-inflamatório e de supressão de mediadores pró-inflamatórios, evitando a destruição tecidual (Krahling *et al.*, 1999; Huynh *et al.*, 2002; Bevers & Willianson, 2016).

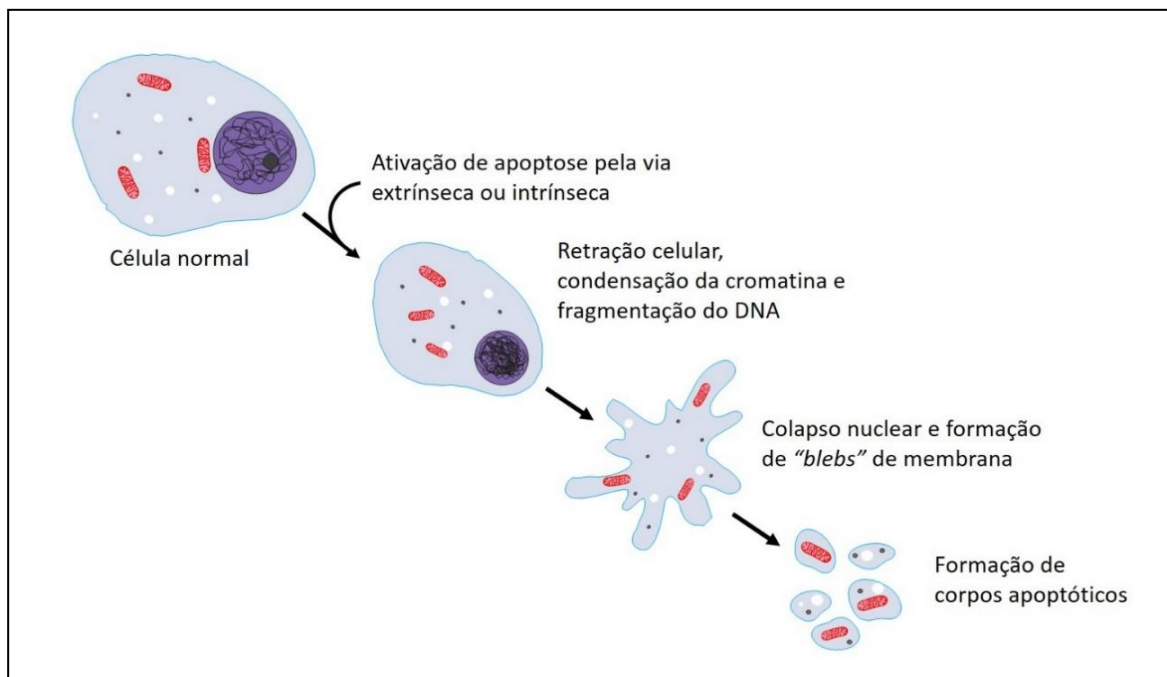


Figura 7: Processo de apoptose. Uma célula normal recebe a sinalização para ativação de apoptose através da via extrínseca (sinalização externa) ou através da via intrínseca (resposta a danos celulares). Em seguida, ocorre a retração do conteúdo celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, colapso nuclear, formação de "blebs" de membrana, culminando na formação de corpos apoptóticos.

A morte celular por apoptose pode ser desencadeada por duas vias: extrínseca e intrínseca (Figura 8). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos aos receptores de membrana, como os receptores da família do fator de necrose tumoral- α . Esta ligação ativa uma cascata de caspases, na qual as caspases 2, 8, 9 e 10 (iniciadoras) são ativadas com a ajuda de moléculas adaptadoras e, assim, clivam e ativam as caspases 3, 6 e 7 (efetoras) responsáveis

pela clivagem de várias proteínas, desencadeando, assim, a morte por apoptose (Daniel *et al.*, 2001; Budihardjo *et al.*, 1999; Naismith & Sprang, 1998). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como por exemplo, a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Sinais transduzidos em resposta a estas alterações alcançam as mitocôndrias (Hengartner, 2000). Estes sinais levam à alteração da permeabilidade e ao colapso do potencial da membrana mitocondrial, resultando em ruptura e liberação de moléculas pró-apoptóticas no citosol (Loeffler & Kremer, 2000; Gupta, 2003). Estes eventos interferem na homeostase celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, que induzem a oxidação de macromoléculas, tais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Green & Kroemer, 2004) e a ativação da caspase 9 (iniciadora) e, em seguida, das caspases 3, 6 e 7 (efetoras) (Gottlieb *et al.*, 2000; Kroemer & Reed, 2000; Gottlieb, 2001) desencadeando a apoptose.

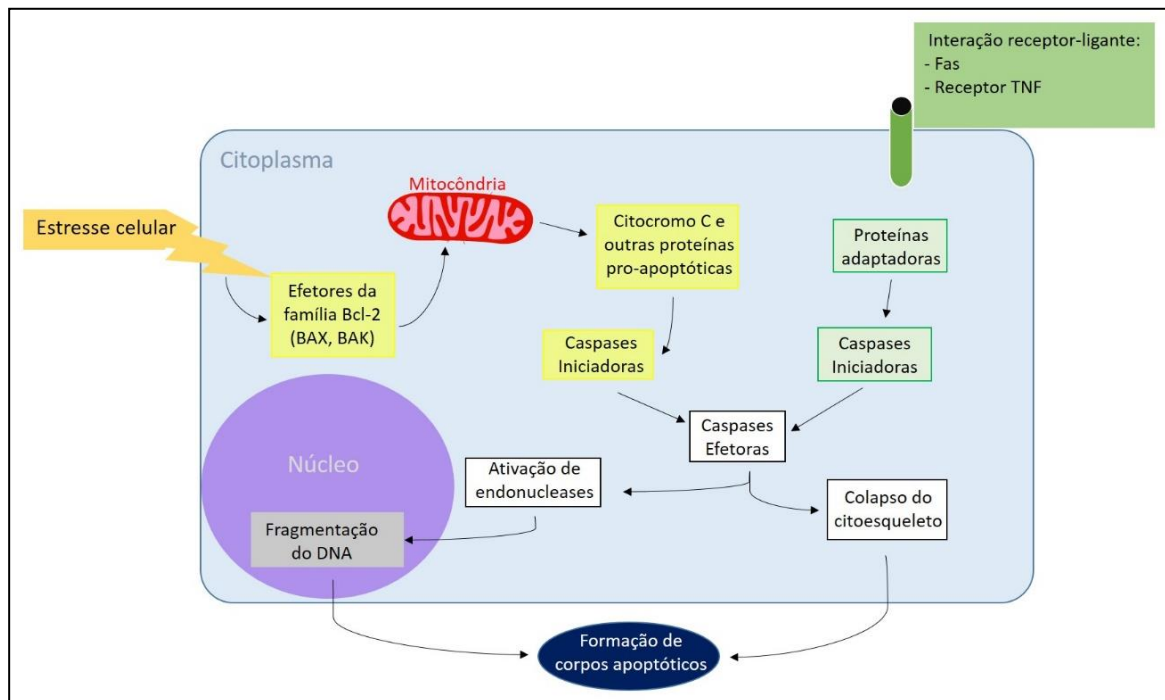


Figura 8. Vias de ativação do processo de apoptose. A sinalização via intrínseca (amarelo) ocorre em resposta a estresse celular, ativa os membros efetores da família Bcl-2 (BAX, BAK), levam à alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial acarretando em seu colapso, que libera Citocromo C e outras moléculas pró-apoptóticas no citoplasma. Essas moléculas levam a ativação da caspase 9 (iniciadora) e das caspases 3, 6 e 7 (efetoras). A sinalização pela via extrínseca (verde) inicia-se com a ligação de ligantes específicos aos receptores de membrana (receptores da família do fator de necrose tumoral alfa, por exemplo). Uma cascata de sinalização onde proteínas adaptadoras se ligam às caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10), ativando-as, é então disparada. Essas caspases iniciadoras, por sua vez, clivam e ativam caspases efetoras (3, 6 e 9). As caspases efetoras levam ao colapso do citoesqueleto e à ativação de endonucleases, que clivam o DNA, levando à formação de corpos apoptóticos.

As caspases são proteases de cisteína-aspartato específicas expressas como pró-enzimas conhecidas como zimogênios. Estas proteínas são responsáveis pela clivagem de inúmeros substratos que têm resíduos de aspartato, conduzindo, por exemplo, a condensação e fragmentação de DNA (Enari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997) e externalização de PS através da clivagem de flipases (Segawa *et al.*, 2014). A externalização de PS sinaliza a apoptose e induz a fagocitose destas células por células vizinhas ou por fagócitos profissionais (Nicholson & Thornberry, 1997; Boatright & Salvesen, 2003).

2.4.2. Apoptose-like

A morte celular por apoptose-like foi descrita em diferentes microrganismos, tais como levedura (Frohlich & Madeo, 2000; Madeo *et al.*, 1999), apicomplexas (Picot *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2003), cinetoplastídeos (Ameisen *et al.*, 1995; Arnoult *et al.*, 2002) e em microrganismos de outros filós, tais como *Trichomonas* (Chose *et al.*, 2003; Mariante *et al.*, 2003; 2005), *Giardia* (Chose *et al.*, 2003) e Entamoeba (Huston *et al.*, 2000). As características de apoptose nestes organismos são colapso no potencial de membrana da mitocôndria e degradação do DNA (Arnoult *et al.*, 2002; Picot *et al.*, 1997). Isso ocorre durante condições de estresse ou no desenvolvimento normal do parasito.

Outras situações podem induzir a apoptose em microrganismos, tais como o tratamento com agentes quimioterápicos. O tratamento de macrófagos infectados com *L. donovani* com antimoniais pentavalentes induz à liberação de espécies reativas de oxigênio pelo parasito, perda do potencial de membrana mitocondrial e aumento de Ca^{2+} citosólico. De maneira semelhante, foi demonstrado que veneno de *B. jararaca* induz a condensação citoplasmática, perda de potencial de membrana, exposição de PS, ativação de caspase 3 like e fragmentação nuclear em *T. cruzi* (Deolindo *et al.*, 2005; 2010). Essas mudanças são observadas em células que morrem por apoptose (de Freitas Balanco *et al.*, 2001; Sudhandiran & Shana, 2003; Wanderley *et al.*, 2006; Wanderley & Barcinski, 2010).

2.4.3. Mimetismo apoptótico

Fosfatidilserina (PS) é um fosfolípido presente na membrana plasmática e possui grande importância no processo de sinalização que envolve a captação de células apoptóticas (Fadok *et al.*, 2001; Frey e Gaipl, 2011; Clark; 2011). A exposição de PS na face externa da membrana plasmática é considerada de fundamental importância na sinalização imunossupressiva na eferocitose, no câncer e em doenças infecciosas (Birge *et al.*, 2016; Bevers & Willianson, 2016). Possui também papel chave na formação de miotúbulos (Van Den Eijnde *et al.*, 2001), transdução de sinal em linfócitos não apoptóticos (Elliott *et al.*, 2005), ativação de plaquetas (Lentz, 2003), capacitação espermática (Gadella & Harrison, 2002) e é descrito como mecanismo de evasão de alguns parasitos (de Freitas Balanco *et al.*, 2001; Seabra *et al.*, 2004;

DaMatta *et al.*, 2007; Wanderley *et al.*, 2006; 2009; Santos *et al.*, 2011; Birge *et al.*, 2016).

A fagocitose por macrófagos de células em processo de apoptose induz resposta anti-inflamatória através da sinalização inicializada pelo reconhecimento de PS externalizada na membrana da célula ou corpo apoptótico (Fadok *et al.*, 1998). Um dos eventos inibidos durante a fagocitose de células apoptóticas é a produção de óxido nítrico (NO), agente microbicida produzido por macrófagos (Fadok *et al.*, 1998). A produção de NO ocorre na presença de L-arginina e da enzima NO sintase induzível (iNOS) (MacMicking *et al.*, 1997). Em organismos unicelulares, foi proposto um tipo de morte no qual uma parte da população morre por apoptose-like, expõe PS, desativa a resposta microbicida do hospedeiro, e beneficia o restante da população parasitária, que não morre e estabelece a infecção. Esta morte “altruísta” ocorre em levedura (Frohlich & Madeo, 2000) e tripanossomatídeos (Moreira *et al.*, 1996, Das *et al.*, 2001; Dos Reis e Barcinski, 2001; Wanderley *et al.*, 2010), foi sugerido que esses organismos utilizam este tipo de morte para controlar a densidade da população no hospedeiro e, assim, beneficiar a infecção. Em 2001, De Freitas Balanco e cols. demonstraram pela primeira vez, em *L. amazonensis*, que a exposição de PS pode ocorrer sem morte por apoptose. De acordo com esse grupo, amastigota de *L. amazonensis*, forma do parasito responsável pelo crescimento e infecção em hospedeiros mamíferos, foi capaz de escapar da atividade microbicida dos fagócitos. Essas amastigotas são capazes de expor PS, de um modo semelhante ao que ocorre em células apoptóticas, inibindo a atividade pro-inflamatória dos macrófagos. Este processo foi denominado mimetismo apoptótico (de Freitas Balanco *et al.*, 2001) (Figura 9). Desde então esse processo foi mostrado em outros parasitos, tais como *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011) e *T. cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007).

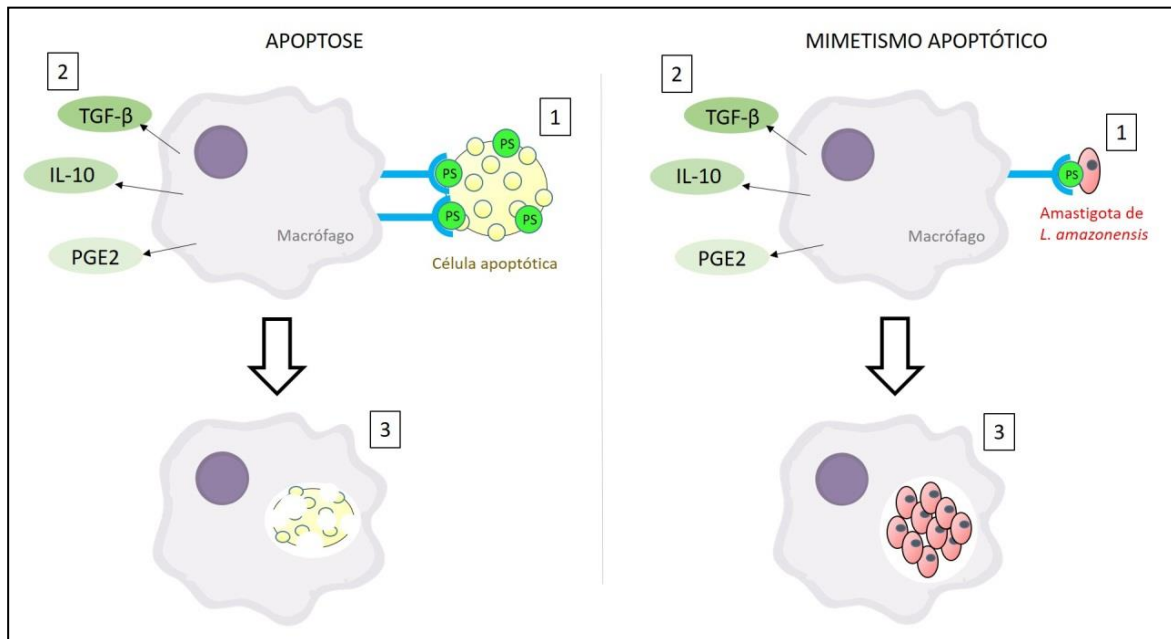


Figura 9. Apoptose e Mimetismo apoptótico. Na fagocitose de células apoptóticas a fosfatidilserina (PS) exposta na face externa da membrana é reconhecida pelo macrófago (1), que secreta citocinas anti-inflamatórias e PGE2 (2), e a célula em apoptose é degradada silenciosamente (3). No mimetismo apoptótico, o parasito expõe PS e é reconhecido pelo macrófago como uma célula apoptótica (1). Ocorre, assim a secreção de agentes antiinflamatórios, que desativam a atividade microbicida do organismo (2). Isto permite que os parasitos se desenvolvam no interior destas células (3).

2.4.3.1. Mimetismo apoptótico em *Toxoplasma gondii*

A produção de NO por macrófagos ativados controla o desenvolvimento da infecção por *T. gondii* (Adams *et al.*, 1990). No entanto, a infecção por *T. gondii* pode influenciar na via de sinalização que induz a produção de NO por macrófagos (DaMatta *et al.*, 2000; Seabra *et al.*, 2002; 2004; Dobbin *et al.*, 2002; Lüder *et al.*, 2003; Guillermo & DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Padrão *et al.*, 2014). Através da sinalização promovida pela exposição de PS na membrana plasmática de parte da população total de parasitos, é desencadeada a inibição parcial da produção de NO por macrófagos ativados, envolvendo diminuição da expressão de iNOS (Seabra *et al.*, 2002; 2004). Este processo é dependente da invasão ativa do parasito na célula hospedeira (Seabra *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2011). Microglias também expressam iNOS com o estímulo pró-inflamatório, resultando na produção de níveis elevados de NO. Embora o NO seja um agente microbicida importante para a defesa, presente em

quase todos os tecidos, a sua elevada produção pode causar lesão tecidual. Apesar do potencial de toxicidade, a neurodegeneração não acontece durante a infecção crônica por *T. gondii*, pois não existe resposta imune contínua, permitindo a persistência do parasito no interior do sistema nervoso central (Rozenfeld, *et al.*, 2005). A infecção por *T. gondii* de micróglia ativadas por IFN- γ resulta na translocação de Smad 2 para o núcleo, degradação da iNOS, inibição da produção de NO e preservação neuronal (Rozenfeld, *et al.*, 2005). Estes eventos contribuem para a harmonia na interação parasito-hospedeiro (Brionne *et al.*, 2003).

Macrófagos infectados por *T. gondii* produzem TGF- β (Bermudez *et al.*, 1993) e eicosanóides (Thardin *et al.*, 1993). Estas substâncias são desativadoras de macrófagos (Bonta & Parnham, 1978; Ashcroft, 1999). A infecção por *T. gondii* induz a síntese deste fator autócrino, resultando na inibição da produção de NO. Macrófagos infectados com *T. gondii* tratados com anti-TGF- β 1 (anticorpo neutralizante) tiveram a inibição da expressão de iNOS e despolimerização da actina abolidas (Seabra *et al.*, 2004). Proteínas Smad foram identificadas como os principais mediadores intracelulares de sinalização de TGF- β 1 (Roberts, 1999). Smad 3 tem papel central na inibição da atividade promotora de iNOS em macrófagos ativados tratados com TGF- β (Werner *et al.*, 2000). Smad 3 teve o nível de expressão aumentado em macrófagos infectados com *T. gondii* após 2h de infecção. Isto indica que a sinalização de TGF- β 1 é ativada pela infecção desse parasito (Seabra *et al.*, 2004).

Diferentes fatores de transcrição participam na regulação do promotor de iNOS. Um deles é o Fator Nuclear Kappa beta (NF- κ B). A redução na expressão de iNOS (Seabra *et al.*, 2002; Lüder *et al.*, 2003) e redução na translocação de NF- κ B para o núcleo após ativação por LPS foi demonstrada em macrófagos infectados por *T. gondii* (Dobbin *et al.*, 2002; Butcher *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2002). Macrófagos ativados infectados por *T. gondii* mostram menos NF- κ B no núcleo, quando comparados com células não infectadas. O tratamento com anti-TGF- β 1 manteve a presença de NF- κ B nos núcleos de macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2004). Estes trabalhos mostraram que *T. gondii* inibe a produção de NO por exposição de PS, e este evento induz a produção autócrina de TGF- β 1, que regula o estado microbicida em macrófagos.

A população total de *T. gondii* é composta por duas subpopulações com funções distintas: a que expõe PS na face externa de sua membrana plasmática (PS+), e a que não expõe (PS-). Foi demonstrado que camundongos infectados com uma das subpopulações isoladas resistem por menos tempo à infecção, quando comparados a camundongos infectados com a população total de parasitos, da seguinte forma: Parasitas PS+ invadem ativamente as células hospedeiras, inclusive macrófagos, onde desempenham o mimetismo apoptótico e desativam a atividade microbicida do organismo. Em contrapartida, parasitas PS- não são capazes de invadir células hospedeiras ativamente, e dependem da atividade endocítica dessas células. Macrófagos que fagocitam parasitos PS- sinalizam a atividade microbicida no organismo. Camundongos C57/BL6 são capazes de sobreviver mais tempo à infecção pela população total de *T. gondii*, quando comparados à camundongos da mesma linhagem infectados com a subpopulação PS+ ou PS-. Assim, ambas as subpopulações são fundamentais para a sobrevivência dos parasitas e do hospedeiro, visto que a resposta imunológica desencadeada pelos parasitos PS- controla a proliferação dos parasitos PS+ no organismo (Santos *et al.*, 2011). Esses resultados mostraram que o mimetismo apoptótico é fundamental para o sucesso da infecção por *T. gondii*.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de demonstrada a importância do mimetismo apoptótico para o sucesso da infecção por *T. gondii*, ficou claro que a exposição de PS precisa ocorrer de forma controlada, de modo a haverem parasitas que expõem e que não expõem o fosfolípido dentro da população total de parasitas, garantindo a sobrevivência dos parasitas e do hospedeiro. O mecanismo de controle e exposição de PS não havia sido elucidado até então. Assim, o foco deste trabalho foi compreender a maquinaria utilizada por *T. gondii* para execução deste mecanismo de evasão.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Elucidar a origem das subpopulações PS+ e PS- em taquizoítas de *Toxoplasma gondii*.

4.2. Objetivos específicos:

1. Verificar, por citometria de fluxo, o tamanho, complexidade interna e a quantidade de material genético nas subpopulações isoladas de *T. gondii*;
2. Quantificar, por espectrofotometria, o material genético presente nas subpopulações isoladas de *T. gondii*;
3. Analisar a variação no percentual de parasitas que expõem PS ao longo do ciclo celular, pós infecção *in vitro*, por citometria de fluxo;
4. Verificar se há relação entre a resposta imunológica do hospedeiro e o percentual de parasitas que expõem PS por citometria de fluxo, através de teste *in vivo* com diferentes linhagens de camundongos;
5. Analisar a expressão de flipase (tg_224190) nas subpopulações de *T. gondii* por reação em cadeia da polimerase (pcr) e eletroforese em gel;
6. Construir *T. gondii* mutante com sequência de flipase (tg_224190) adicionada à uma sequência detectável (tag-HA);
7. Analisar por imunofluorescência a localização da flipase (tg_224190) em *T. gondii*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Células LLC-MK2

Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), LLC-MK2 (ATCC CCL7, Rockville, MD/EUA) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal de bovino (SFB) a 10%, 5% de CO₂ a 37°C. As células multiplicavam-se até a formação de monocamada, aderente à superfície do frasco de cultura. A subcultura dessas células originava-se de culturas confluentes, enquanto a infecção com o parasito era realizada em culturas subconfluentes. As células eram subcultivadas, a partir de suspensões celulares obtidas por tripsinização dos frascos de células em monocamada.

5.2. Taquizoítas de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítas de *T. gondii* (Cepa RH) foram mantidos por passagens intraperitoneais em camundongos suíços (CF-1) de três semanas de idade. Após 48h de infecção, os parasitos eram coletados em solução salina tamponada (PBS) através de lavagem peritoneal. O lavado peritoneal passava por centrifugação (100g; 5 min; 4°C), para a retirada das células e restos celulares peritoneais e o sobrenadante coletado era novamente centrifugado (1000g; 10 min; 4°C), para a obtenção das formas taquizoítas. Os parasitos contidos no pellet eram ressuspensos em meio de cultura DMEM (do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e uma amostra era fixada (4% de formaldeído nascente em PBS) para quantificação através da câmara de Neubauer ao microscópio óptico Axioplan – ZEISS. Os dados da quantificação serviam para ajuste da proporção de parasitos utilizada nos ensaios antiproliferativos. A utilização de camundongos para passagens de taquizoítas de *T. gondii*, possibilitando a execução deste trabalho, foi aprovada pela Comissão de Ética de Uso de animais (CEUA) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (código: IBCCF99).

5.3. Isolamento das subpopulações PS + e PS-

Parasitos foram coletados de camundongos infectados, como descrito acima, e 2×10^8 taquizoítas foram incubados com anexina - V conjugada à microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). Após 40 min, a suspensão de células foi adicionada à uma coluna magnética, mantendo apenas os parasitos PS+ aderidos à coluna;

parasitos PS- foram eluídos, coletados e salvos. Parasitas PS+ foram retirados da coluna usando as instruções do fabricante.

5.4. Determinação do estágio de ciclo celular das subpopulações de parasitas por citometria de fluxo

Após o isolamento das subpopulações PS+ e PS- de *T. gondii*, os parasitas foram fixados em solução de etanol à 70% em água deionizada e mantidos à -20°C por, pelo menos, 12hs. Em seguida, os parasitos foram centrifugados para retirada do etanol (6500 rpm por 5 min em microcentrífuga eppendorf) e ressuspensos em solução de 50µM Tris, pH 7.5, contendo iodeto de propídio (0,1mg/ml). Após, foi adicionada RNase cocktail (RNase A, RNase T1, Ambion corp., Austin TX) na proporção de 1:100 da solução de ligação por 30min. A análise foi realizada por citometria de fluxo e os dados analisados no programa WinMDI.

5.5. Análise por citometria de fluxo da variação da exposição de PS em *T. gondii* em diferentes tempos pós-infecção.

Frascos de cultura de células de 25 cm² contendo células LLC-MK2 em confluência foram infectadas com 10⁶ taquizoítas de *T. gondii*. Após 1h, as interações foram lavadas para retirada dos parasitas que não penetraram nas células. Em seguida, foi adicionado meio de cultura (DMEM) contendo Pirrolidina ditiocarbamato de potássio (PDTTC), uma droga que interrompe, reversivelmente, a divisão do parasito, mantendo-o na fase G1. Após 6h, as culturas foram lavadas para retirada completa da droga. Nos tempos de 1, 6, 9 e 12hs após a retirada da droga, as culturas foram raspadas para obtenção dos parasitas, que foram purificados e incubados por 1h, em temperatura ambiente, com annexina – V/FITC. Após a incubação, os parasitas foram submetidos à citometria de fluxo para quantificação da exposição de PS pelos mesmos. Os dados foram analisados no programa WinMDI.

5.6. Quantificação do material genético presente nas subpopulações isoladas de *T. gondii* por espectrofotometria

A extração de DNA da população total e das subpopulações PS+ e PS- de *T. gondii* foi realizada com a utilização do QIAamp DNA mini Kit (Qiagen Inc, Valencia, US), seguindo o protocolo cedido pelo fabricante. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria, em NanoDrop.

5.7. Análise por bioinformática e eleição da flipase para o estudo

Por bioinformática, foi realizado o Blast (alinhamento de regiões com sequências similares - NCBI) a partir da flipase P4 de humano (responsável pela internalização de PS), contra o genoma de *T. gondii*. A sequência com maior similaridade (TGME49_224190) foi analisada no ToxoDB, para obtenção dos dados relativos à expressão gênica dessa proteína em *T. gondii*.

5.8. Avaliação da expressão de flipase nas subpopulações isoladas de *T. gondii*

Após o isolamento das subpopulações PS+ e PS- de *T. gondii*, o RNA total do parasita foi obtido a partir do kit RNAEasy (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Em seguida, 2 µg de RNA purificado foi submetido à transcrição reversa (RT)-PCR (60 min de transcrição reversa à 42 °C, utilizando Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase - M-MLV RT, Promega). O cDNA resultante foi amplificado utilizando-se Expand High Fidelity PCR (Roche), com os iniciadores ToxFLIP_F (5'CTCGGTCTTGACTACGTTTCC3') e ToxFLIP_R (5'GTGAGATCCCTTCGGCTG3'). Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel.

5.9. Microscopia eletrônica de varredura

Após 24h de interação entre macrófagos peritoneais de camundongos e taquizoítas de *T. gondii*, as amostras foram fixadas em solução contendo 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (de 30 a 100%), por 20 minutos em cada etapa, secas usando ponto crítico de CO₂, montadas em stubs. As amostras foram cobertas com ouro (20–30 nm) para observação em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 6490LV.

5.10. Análise da influência da resposta imunológica do hospedeiro na exposição de PS por *T. gondii*.

Três linhagens com comportamentos imunológicos distintos frente à infecção por *T. gondii* foram utilizadas neste experimento: Balb/C, CF1 e C57-BL6. Seis camundongos de cada linhagem foram infectados com 10³ parasitas, cepa RH. Dois dias após a infecção, os parasitas foram obtidos através de lavado peritoneal, centrifugados à 800 rpm/10min, ressuspensos em PBS e quantificados em câmara de Neubauer. Em seguida, 10⁴ parasitas foram incubados com Anexina-V FITC por 1 hora, e com iodeto de propídio por 5 minutos. Após, material incubado contendo os parasitas oriundos de cada uma das cepas de camundongos utilizadas foi analisado

em um citômetro de fluxo FACScalibur – UEZO. A utilização dos animais para realização deste experimento foi aprovada pela Comissão de Ética de Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

5.11. Construção de *T. gondii* com sequência de flipase (tg_224190) adicionada a um tag HA

Um tag-HA foi adicionado à sequência da flipase para formação de um vetor de expressão detectável deste gene. Para isso, o cDNA da flipase foi clonado no vetor p7TetOS1 e p7TetOS4, depois do promotor de indução. Foi realizado PCR utilizando-se oligonucleotídeos ToxFlipHA-as (antisense) e ToxFlipHA-s (sense). Os fragmentos resultantes do PCR foram digeridos por Nsil e religados, resultando nos vetores de expressão T7S1ToxFlipHA e T7S4ToxFlipHA, respectivamente. A fim de gerar parasitos estáveis com cada construção, foi realizada uma co-transfecção de 60µg de T7S1ToxFlipHA ou T7S4ToxFlipHA com 30 µg de pDHFR (Donald and Roos, 1993). A construção flipase-HA foi baseada no vetor pT230CAT (Soldati e Boothroyd, 1995), no qual as regiões 5'UTR e 3'UTR foram amplificadas e inseridas nos sítios de restrição KpnI e BamHI/NotI, respectivamente. 30 µg da construção ToxFlipHACAT foi transfectada e, em seguida, foi realizada a seleção por CAT. Parasitos ToxFlipHA foram isolados, para obtenção de um grupo estável de transfectantes, por diluição limitante e identificados via PCR genômico usando combinações de nucleotídeos. Parasitos Flip-HA foram avaliados em ensaios de imunoblot e imunofluorescência para confirmar a expressão de ToxFlipHA. Os primers utilizados foram: Flip_5'F_1000: 5' GGTCTTGCCAGATCGTCAAG 3'; Flip_5'F_2000: 5' TTAAATTCGTCTTACAAGCGTAGG 3'; Flip_5'R: 5' CCGCGGGCGGGTTTGAATGCAAGTTTCGTGCTGAAAGGAGACTGAAAATGAA GAGAAC 3'; Flip_3'F: 5' GTTCTGGCAGGCTACAGTGACACCGCGGTGGGAGGAGCGCAGAACGAAG 3'; Flip_3'R_2000: 5' TCTTGTCTATCTGCAAGAACGG 3'; Flip_3'R_1000: 5' ATGCAGGCACTCGTTACG 3'.

5.12. Análise por imunofluorescência da localização da flipase (tg_224190) em *T. gondii*

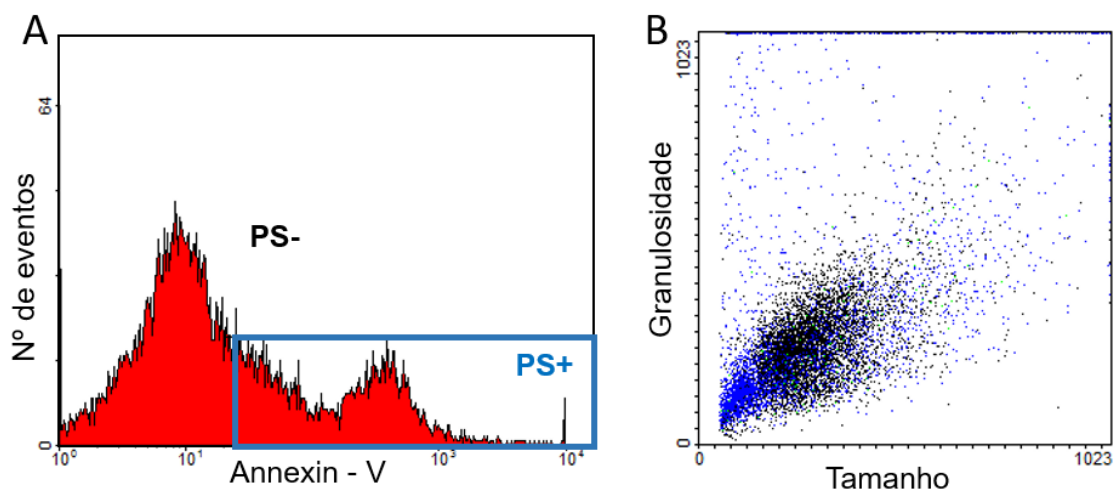
Células LLC-MK2 foram infectadas com taquizoítas e, após 48 h, lavadas com PBS e fixadas com 4 % de formaldeído nascente em tampão PHEM (60mM Pipes, 20mM Hepes, 10mM EGTA, 5 mM MgCl₂, e 70mM KCl, pH 7.2). Após fixação, as lamínulas foram lavadas, permeabilizadas com Triton X-100 2% em tampão PHEM, e incubadas com 50 mM de Cloreto de Amônio (NH₄Cl) por 30 min, em seguida com Soro Albumina Bovina (Sigma) 3% em tampão PHEM (PHEM-BSA) por 30 min a temperatura ambiente. Após a incubação com os bloqueios, as células foram incubadas por 1 h com anti-HA (rabbit - Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA - diluição 1:1000) e com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-IMC1 (Mouse - diluição 1:1000) (cedido gentilmente por Dr. Gary Ward, Universidade de Vermont, USA). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com Alexa-546 (diluição 1:100) (Molecular Probes) e com anticorpo rabbit anti-mouse Alexa488 (diluição 1:100 - Molecular Probes). Após marcação, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas com o reagente “ProLong® Gold antifade” (Invitrogen) com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) e observadas no microscópio Zeiss Axioplan equipado com contraste diferencial de interferência e iluminação epifluorescente e lâmpada de mercúrio HBO100.

6. RESULTADOS

6.1. Análise por citometria de fluxo do tamanho e complexidade interna das subpopulações PS+ e PS- de *T. gondii*

Através da análise dos gráficos gerados, podemos observar que parasitas PS+ (Figura 10 B, azul) são menores e possuem complexidade interna (granulosidade) inferior, quando comparados à parasitas PS- (Figura 10 B, preto).

Figura 10: *Toxoplasma gondii* PS+ são menores em tamanho e complexidade interna quando



comparados aos PS-. Através da marcação de PS em *T. gondii* e análise por citometria de fluxo, observa-se que os parasitas PS+ são menores e possuem complexidade interna inferior (B – Azul) quando comparados aos parasitas PS- (B – Preto).

6.2. Determinação do estágio de ciclo celular das subpopulações de *Toxoplasma gondii*.

Observa-se que parasitas PS+ (Figura 11 A, vermelho) possuem quantidade de material genético muito inferior à quantidade encontrada na subpopulação PS- (Figura 10 B, verde). Nota-se, ainda, que pode haver uma pequena quantidade de parasitas PS+ contidos na subpopulação PS- (Figura 11 B, vermelho). Na figura 11 C, fica evidente o pico de fluorescência em torno de 60 na subpopulação PS+ e em 400, na subpopulação PS-.

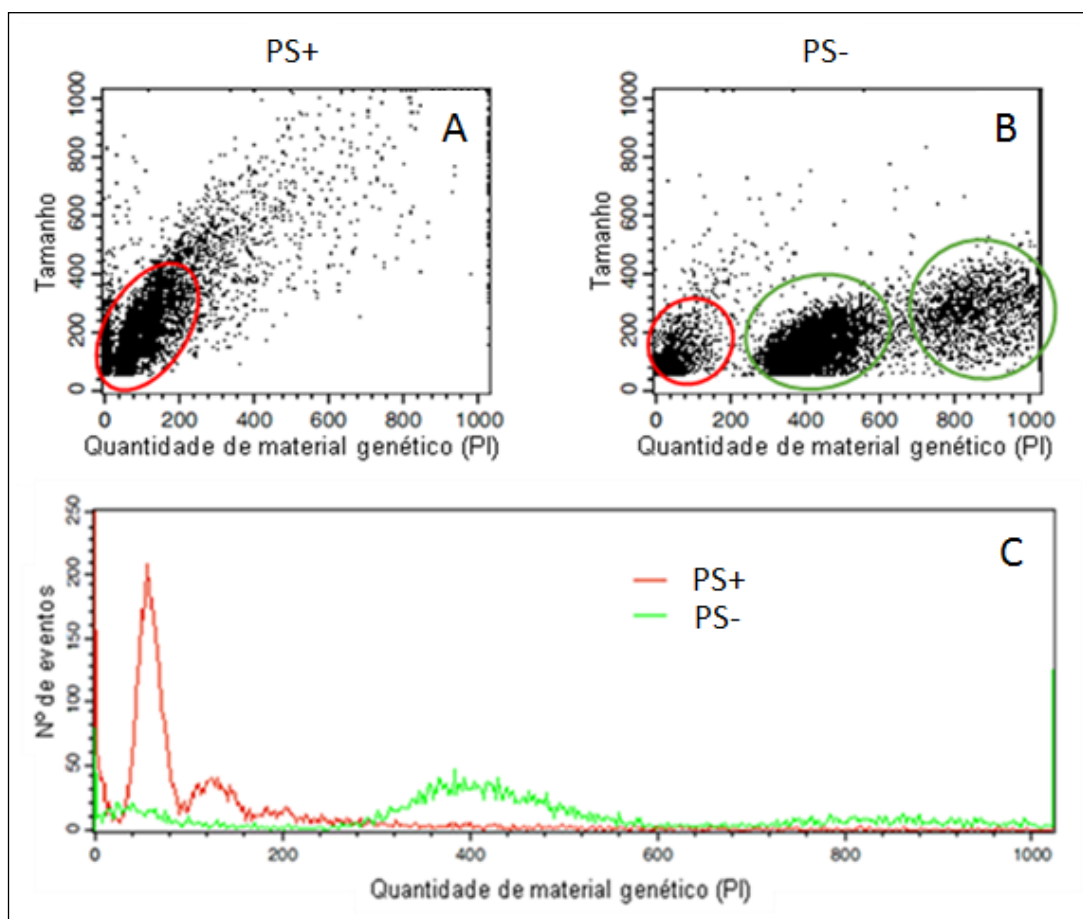


Figura 11: Determinação do estágio de ciclo celular das subpopulações de *Toxoplasma gondii* por citometria de fluxo. (a) Fluorescência relativa à marcação com PI do material genético contido na subpopulação PS+ (vermelho = população de parasitas). (b) Fluorescência relativa à marcação com PI do material genético contido na subpopulação PS- (vermelho = possível população de parasitas PS+; verde = populações de parasitas PS-). (c) Fluorescência relativa às subpopulações isoladas de *T. gondii* após marcação com PI. Nota-se o pico de fluorescência da subpopulação PS+ em torno de 60 (vermelho) e pico de fluorescência da subpopulação PS- entre 360 e 440 (verde). Dados representativos de três experimentos distintos.

6.3. Quantificação de DNA das subpopulações isoladas de *Toxoplasma gondii*

Os resultados (Figura 12) mostraram quantidade superior de DNA na subpopulação PS- (4,7 ng/ μ l), em comparação com a subpopulação PS + (2,6 ng/ μ l).

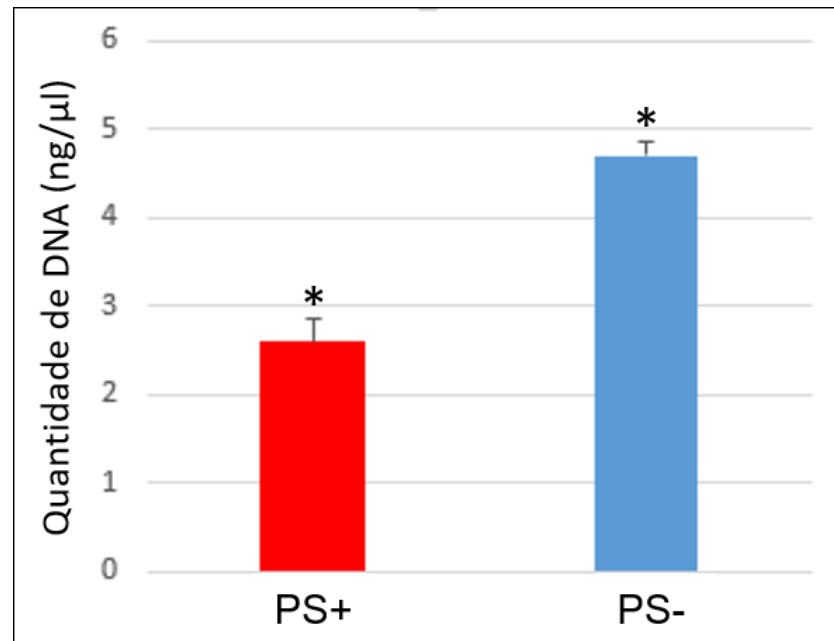


Figura 12. Análise quantitativa do DNA das subpopulações de *Toxoplasma gondii* por espectrofotometria. Observe que a subpopulação PS- (Azul, 4,7 ng/ μ l) possui, aproximadamente, o dobro da quantidade de DNA contida na subpopulação PS+ (Vermelho, 2,6 ng/ μ l). Dados representativos de três experimentos distintos. * $p \leq 0,05$

6.4. Análise da exposição de PS em diferentes estádios do ciclo celular das subpopulações isoladas de *Toxoplasma gondii* durante interação com células LLC-MK2.

Observe que há aumento significativo da exposição de PS após 12h de interação a variação do percentual de parasitas PS+ ao longo do tempo (Figura 13).

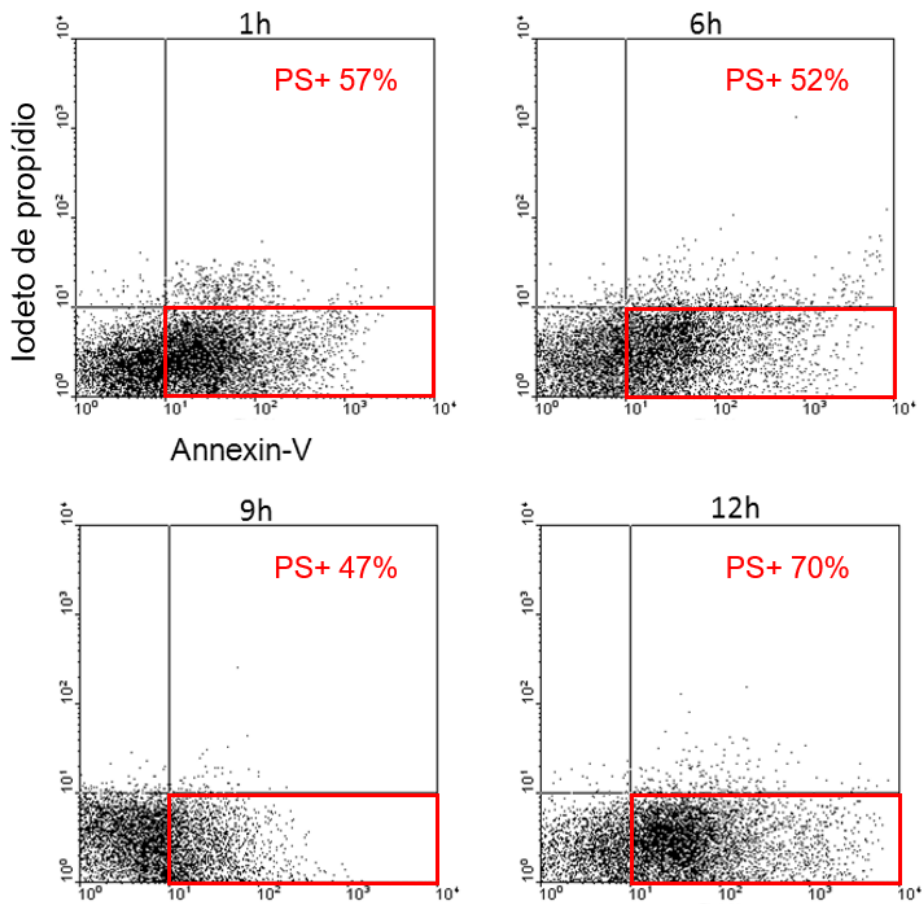


Figura 13. Análise da exposição de PS em diferentes estádios do ciclo celular das subpopulações isoladas de *Toxoplasma gondii* durante interação com células LLC-MK2. A. Análise por citometria de fluxo da exposição de PS por *T. gondii* em diferentes tempos pós-infecção. Note que somente após o período de 12h houve aumento expressivo na exposição de PS por *T. gondii*.

6.5. Análise do mecanismo de invasão da subpopulação PS- de *T. gondii* durante interação com macrófagos peritoneais de camundongos.

Com esse resultado, observa-se que o parasita, em fase de divisão, é fagocitado pelo macrófago.

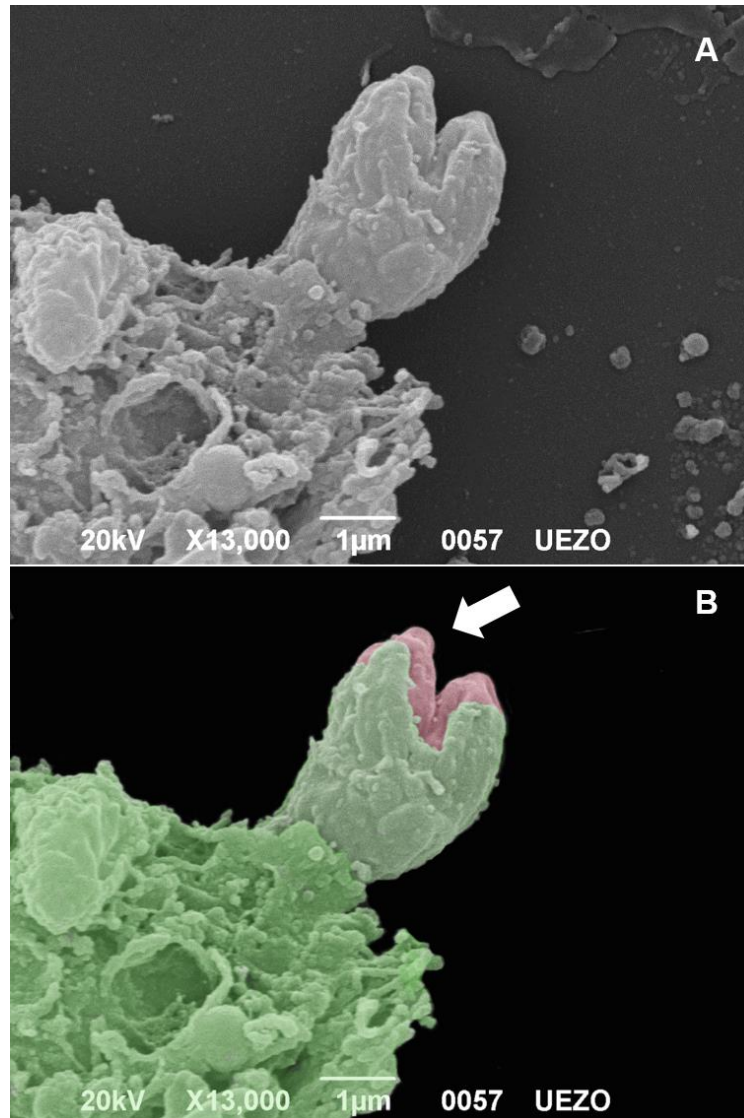


Figura 14: Macrófago fagocitando parasita PS-. Observe que o parasita encontra-se na fase M/C (mitose/citocinese) e seu complexo apical está voltado para a região oposta à célula hospedeira (seta).

6.6. Análise da relação entre a resposta imunológica do hospedeiro e a exposição de PS por taquizoítas de *T. gondii*

Os resultados (Figura 15) demonstram que a exposição de PS não se altera significativamente após a infecção em diferentes linhagens de camundongos.

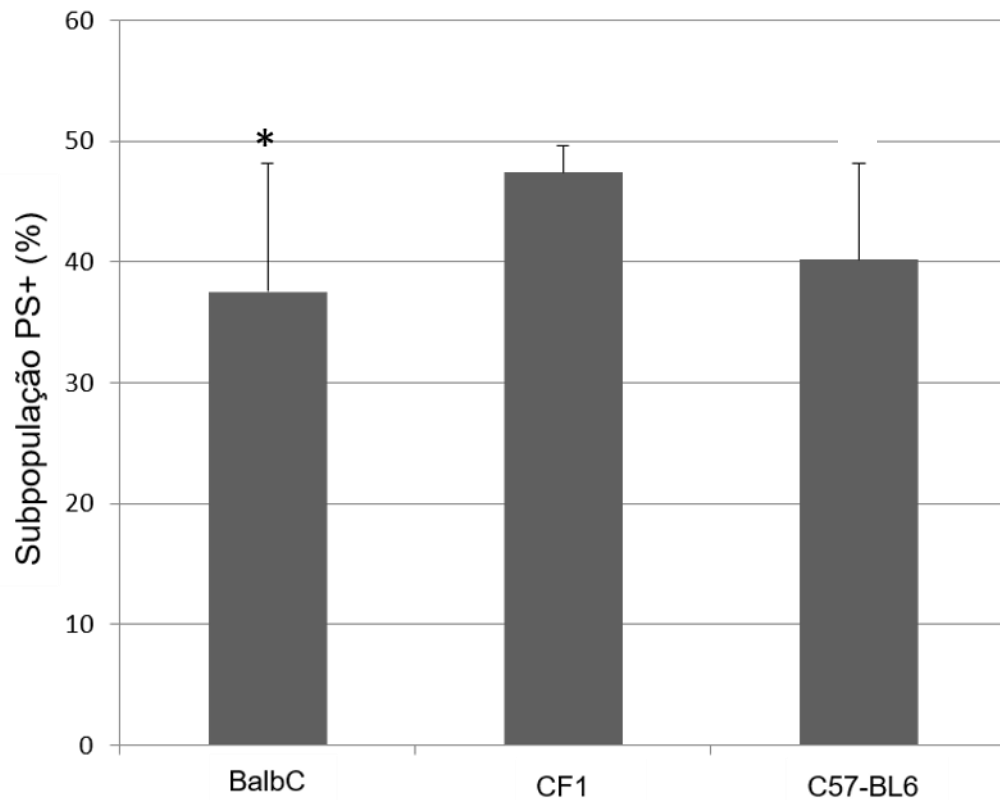


Figura 15: Relação entre a resposta imunológica do hospedeiro e a exposição de PS por *T. gondii*. Não houve alteração significativa no percentual de parasitas que expõem PS (* $p \geq 0,05$).

6.7. Localização da flipase com papel fundamental para translocação de PS em *T. gondii*.

Na figura 16A, observa-se oscilação na expressão de flipase. Este dado é um indício que a maior expressão de flipase nas fases de divisão do parasita pode ser a causa da ausência de PS na face externa da membrana do parasita (PS-). Podemos observar, ainda, que o perfil de expressão da flipase varia de acordo com a cepa de *T. gondii* (Figura 16 B).

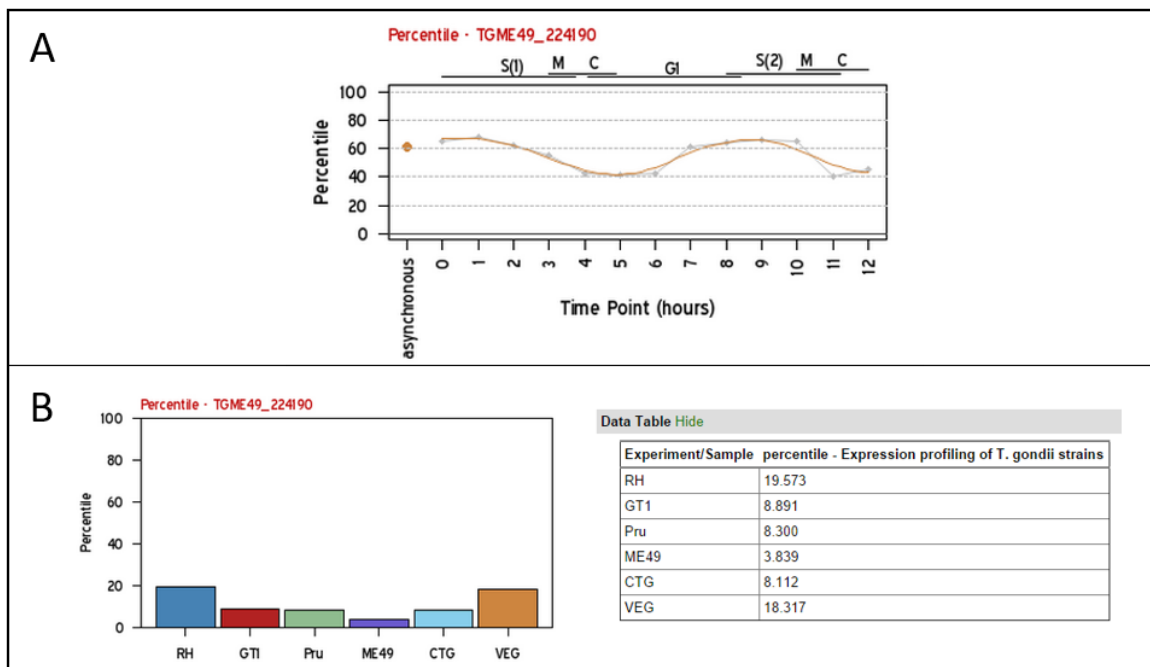


Figura 16: Perfis de expressão da flipase TGME49_224190. Em A, há oscilação no percentual de expressão ao longo do tempo, durante as fases da divisão do parasita por endodiogenia. Em B, há diferença no percentual de expressão dessa flipase em diferentes cepas do parasita. Fonte: ToxoDB.com

6.8. Análise da expressão da flipase TGME49_224190 nas subpopulações PS+ e PS- de taquizoítas de *T. gondii*

O resultado demonstrou que há maior expressão de mRNA de flipase nos parasitas PS- (Figura 17).

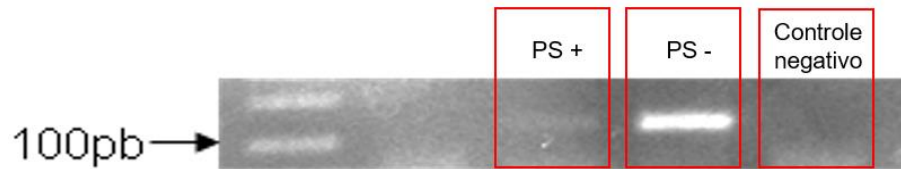


Figura 17: Expressão de mRNA de flipase nas subpopulações isoladas e na população total de *T. gondii* por RT-PCR e eletroforese em gel. Controle negativo sem a enzima transcriptase reversa. Resultado representativo de três experimentos independentes.

6.9. Análise da localização da flipase TGME49_224190 em taquizoítas de *T. gondii* mutantes.

Por imunofluorescência, podemos observar que: parasitas em fase de divisão (Figura 18, seta larga) apresentam a marcação para flipase mais dispersa pelo corpo do parasita; Parasitas que não estão em fase de divisão (Figura 18, seta fina) apresentam marcação mais pontual.

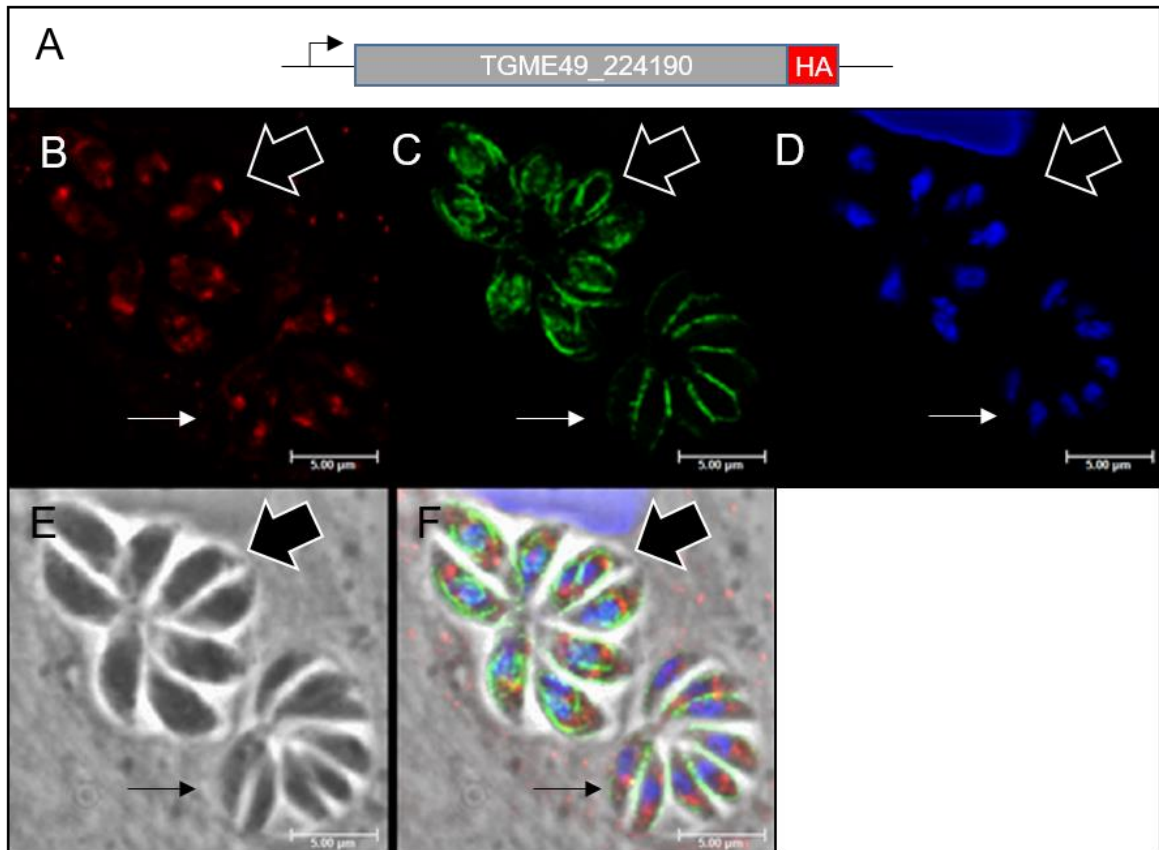


Figura 18: Imunofluorescência para localização de flipase (Tg_224190) em *T. gondii*. A – representação esquemática da sequência Tg_224190 acrescida da sequência detectável HA. Em B, observa-se que em parasitas que não se encontram em fase de divisão, a marcação para flipase encontra-se mais dispersa no citoplasma e, em parasitas que não aparentam estar em fase de divisão, a marcação é mais pontual. B – HA- flipase; C – IMC2; D – DAPI; E – Contraste de fase; F – Sobreposição das imagens.

7. DISCUSSÃO

A Toxoplasmose afeta cerca de um terço da população mundial, causando maiores danos em imunodeprimidos, gestantes e animais de importância econômica (Lyons e Johnson, 1995; Sibley *et al.*, 2010). Tal distribuição da doença se dá pela grande capacidade adaptativa do parasita causador ao longo dos anos. *Toxoplasma gondii* é intracelular obrigatório, capaz de causar a infecção em animais homeotérmicos e possui diversos mecanismos para evadir-se da resposta imune do hospedeiro (Tenter *et al.*, 2000; Carruthers *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2010). Dentre esses mecanismos, o foco do nosso grupo é o mimetismo apoptótico, artifício que o parasita utiliza para promover a mesma sinalização anti-inflamatória que é induzida através do reconhecimento de fosfatidilserina (PS) exposta por células em processo de apoptose (Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011). Assim, parte da população total de parasitas expõe PS em sua membrana (PS+) e parte não (PS-). Vimos que as subpopulações, PS+ e PS-, invadem células de maneiras distintas e que ambas são fundamentais para o sucesso da infecção e sobrevivência dos parasitas e do hospedeiro (Santos *et al.*, 2011). Desde então, nosso objetivo foi descobrir quais os mecanismos envolvidos no controle de exposição de PS em taquizoítas de *T. gondii*.

Gaji e colaboradores demonstraram em 2010 que a expressão gênica varia de acordo com a evolução do ciclo celular do parasita onde, na fase G1, a expressão gênica é voltada para a invasão e sobrevivência extracelular, enquanto parasitas em fase de divisão (S, M/C) possuem a expressão voltada para a divisão celular e sobrevivência no ambiente intracelular. Com base nesses dados, decidimos analisar se a exposição de PS possui relação com o ciclo celular do parasita, visto que parasitas PS+ são mais invasivos e comportam-se como os parasitas na fase G1 descritos por Gaji, enquanto os parasitas PS- comportam-se como os parasitas nas fases de divisão. Duas questões foram delimitadas: A primeira possuía relação com o mecanismo utilizado pelo parasita para controlar a exposição de PS, visto que tanto parasitas PS+ quanto PS- são fundamentais para o sucesso da infecção. A segunda era mais específica e tinha como objetivo esclarecer a maquinaria utilizada pelo parasita para expor/internalizar PS.

O primeiro passo deste trabalho foi verificar, por citometria de fluxo, o tamanho e a complexidade interna das subpopulações PS+ e PS- de taquizoítas de *T. gondii*.

Com o resultado observamos que parasitas PS+ possuem tamanho e complexidade interna menores que o restante da população. Em seguida, ainda por citometria, realizamos a análise qualitativa do material genético presente em cada uma das subpopulações e, assim, confirmamos que parasitas PS+ e PS- encontravam-se em diferentes fases de seu ciclo celular, visto que parasitas na fase G1 possuem menor quantidade de material genético quando comparados à parasitas nas fases S e M/C (divisão) (Gaji *et al.*, 2010).

A fim de corroborar o resultado anterior, o material genético de cada uma das subpopulações foi purificado e quantificado por espectrofotometria. O resultado demonstrou que parasitas PS+ possuem praticamente metade da quantidade de material genético, quando comparados aos parasitas PS-. Assim, confirmamos o resultado anterior demonstrando que parasitas PS- encontram-se em fase de divisão, enquanto parasitas PS+ não.

Um novo experimento foi realizado para estabelecermos a relação entre exposição de PS e o ciclo celular do parasita, onde a exposição de PS foi analisada em diferentes tempos pós-infecção, por citometria de fluxo. Verificamos que a exposição de PS realmente varia com o tempo de infecção, acompanhando os estádios de desenvolvimento do parasita.

Em 1995, Sibley descreveu duas formas de invasão desempenhadas por *T. gondii*: A penetração ativa, onde o parasita entra em contato com a célula através de sua porção apical, invaginando a membrana da célula hospedeira e formando o vacúolo parasitóforo não-fusogênico; e a penetração dependente do mecanismo endocítico da célula hospedeira, onde não ocorre reorientação do parasita, que é fagocitado. Em 2011, descrevemos que somente parasitas PS+ são capazes de invadir células ativamente, enquanto parasitas PS- dependem do mecanismo endocítico da célula hospedeira (Santos *et al.*, 2011). Através da interação *in vitro* entre *T. gondii* e macrófagos peritoneais de camundongo e posterior análise por microscopia eletrônica de varredura, observamos que parasitas em fase de divisão são fagocitados e que a reorientação do parasita não é necessária para o processo. As características invasivas apresentadas por parasitas em fase de divisão são as mesmas descritas para parasitas PS- (Santos *et al.* 2011), sendo este mais um indício que a exposição de PS é dependente do ciclo celular do parasita.

Wanderley e Barcinski (2010) descreveram que, em *Leishmania*, a exposição de PS pelo parasita possui relação com a resposta imunológica do hospedeiro em reação à infecção. Nenhum dado havia sido apresentado, até então, quanto à influência direta da resposta imunológica do hospedeiro sobre a exposição de PS por *T. gondii* e, portanto, realizamos um teste *in vivo* para verificar se esta relação entre resposta imunológica e exposição de PS ocorre. Para tal, infectamos três diferentes linhagens de camundongos que respondem de formas distintas à infecção por *T. gondii*: a linhagem C57-BL6 é mais susceptível à infecção, a CF1 possui susceptibilidade mediana e a linhagem BALB-C é a menos susceptível (Welter *et al.*, 2007). Os parasitas recuperados do peritônio dos camundongos foram marcados com annexin-V e analisados por citometria de fluxo. Não houve diferença significativa entre o percentual de parasitas PS+ coletados das diferentes linhagens de camundongos, indicando que a resposta imunológica do hospedeiro não possui relação direta com a exposição de PS por taquizoítas de *T. gondii*.

Partindo dos resultados anteriores, iniciamos a segunda fase do projeto, buscando elucidar o mecanismo de exposição de PS por *T. gondii*. Para tal, uma busca foi realizada com o intuito de encontrar o principal translocador de PS, a flipase P4 (Clark, 2011), em taquizoítas de *T. gondii*. Esta flipase é responsável pela internalização de PS na membrana celular de organismos multicelulares. Através de análise no banco de dados ToxoDB e da ferramenta blast, chegamos à flipase tg_224190, que apresentou maior similaridade com a flipase P4. De acordo com os gráficos depositados no ToxoDB para esta flipase, observa-se que sua expressão varia de acordo com o ciclo celular do parasita, sendo mais expressa nas fases de divisão (S, M) e menos expressa na fase G1 inicial e no final da fase de citocinese. Esse resultado corrobora os dados obtidos no primeiro bloco de experimentos, pois a maior expressão desta flipase nas fases de divisão sugere que haverá mais PS sendo internalizada, tornando o parasita PS-. Através dos gráficos de expressão dessa flipase em diferentes cepas de *T. gondii*, observamos que a cepa RH expressa mais flipase, em relação à cepa Me49.

Para explicar esses dados obtidos no banco de dados, revimos e associamos os resultados obtidos por Damasceno-Sá (2013), demonstrando que o percentual de parasitas da cepa RH que expõe PS é menor que o percentual encontrado na cepa ME49; e o dado apresentado por Radke e cols. (2001), demonstrando que parasitas

da cepa RH permanecem maior parte do tempo em fase de divisão, quando comparados à parasitas da cepa Me49. Assim, parasitas da cepa RH tendem a expor menos PS, pois multiplicam-se em menor tempo e entram constantemente em fase de divisão, enquanto parasitas da cepa Me49 expõem mais PS, pois dividem-se mais lentamente e ficam a maior parte do tempo na fase G1. Esta associação de resultados sugere que a exposição de PS pode ser utilizada como um fator de virulência entre cepas de *T. gondii*, onde as mais virulentas dividem-se mais rapidamente e expõem menos PS, enquanto as menos virulentas dividem-se mais lentamente e expõem mais PS.

Para confirmar a relação entre a flipase Tg_224190 com a exposição de PS em taquizoítas de *T. gondii*, as subpopulações PS+ e PS- foram isoladas e realizamos o rt-pcr utilizando os primers para a flipase escolhida. Como esperado, a maior expressão de flipase foi encontrada na subpopulação PS- de parasitas, demonstrando que quanto maior a expressão dessa flipase, menor a exposição de PS em *T. gondii*.

Por fim, realizamos a construção de *T. gondii* mutantes, através da inserção de uma sequência detectável (tag-HA) à sequência da flipase de estudo, objetivando localizar sua distribuição no corpo do parasita. Através desta ferramenta observamos que parasitas em fase de divisão possuem a marcação para tag-flipase distribuída por todo o corpo, enquanto parasitas em fase de não-divisão apresentaram marcação mais pontual. Essa diferença na distribuição da flipase no corpo do parasita pode estar relacionada à exposição de PS. No entanto, novos experimentos com o possível bloqueio da atividade da flipase são necessários para confirmar essa hipótese.

8. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que a exposição de PS em taquizoítas de *T. gondii* ocorre de forma dependente ao estágio do ciclo celular do parasita durante o processo de divisão por endodiogenia, e que esse mecanismo é responsável pelos diferentes perfis de exposição de PS entre cepas de *T. gondii*. Reunimos, ainda, indícios de que a exposição de PS é independente da resposta imunológica do hospedeiro, e de que a flipase Tg_224190 possui papel fundamental no processo de internalização de PS.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.B., HIBBS, J.B., TAINTOR, R.R., KRAHENBUHL, J.L. (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L L-arginine. *J Immunol.*, 144, 2725–2729.
- ANTOINE, J.C., PRINA, E., LANG, T., COURRET, N. (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, 6, 392–401.
- AMBROISE-THOMAS, P., e PELLOUX, H. (1993). Toxoplasmosis—congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitology today*, 9(2), 61-63.
- AMEISEN, J.C., IDZIOREK, T., BILLAUT-MULTO, O., LOYENS, M., YISSIER, J.P., POTENTIER, A., OUAISSI, A. (1995). Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.* 2, 285-300.
- ARNOULT, D., AKARID, K., GRODET, A., PETIT, P.X., ESTAQUIER, J., AMEISEN, J.C. (2002). On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ.*, 9, 65-81.
- ASHCROFT, G. S. (1999). Bidirectional regulation of macrophages function by TGF-beta. *Micr Inf.*, 1, 1275–1282.
- BERMUDEZ, L.E., COVARO, G., REMINGTON, J. (1993). Infection of murine macrophage with *Toxoplasma gondii* is associated with released of transforming grown factor-b and down regulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infection and Immunity*, 61, 4126–4130.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M., JONES, J.L., AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C.C., OREFICE, F., ADISS, D.G. (2003) Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, 1, 55-62.
- BECKERS, C.J., DUBREMETZ, J.F., MERCEREAU-PUIJALON, O., JOINER, K.A. (1994) The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.*, 127, 947–961.

- BEVERS, A. M., WILLIANSO, P. L. (2016). Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol Rev.*, 96:605-645.
- BIRGE, R.B., BOELTZ, S., KUMAR, S., CARLSON, J., WANDERLEY, J., CALIANESE, D., BARCINSKI, M., BREKKEN, R.A., HUANG, X., HUTCHINS, J. T., EMPIG, C., MERCER, J. SCHROIT, A.J., SCHETT, G., HERMANN, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in eferocytosis, infectious disease and cancer. *Cell Death Differ.*, 23(6):962-78.
- BLADER, I. J., SAEIJ, J. P. (2009) Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*, 117, 458–476.
- BOATRIGT, K.M., SALVESEN, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.*, 15:725-731.
- BONTA, I. L., PARNHAM, M. J. (1978). Prostaglandins and chronic inflammation. *Biochemical Pharmacology* 27, 1611–1623.
- BRIONNE, C.T., TESSEUR, I., MASLIAH, E., WYSS-CORAY, T. (2003). Loss of TGF- β 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron.*, 40:1133-1145.
- BROSSIER, F., JEWETT, T.J., LOVET, J.L., SIBLEY, L.D. (2003) C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 6229–6234.
- BUDIARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X., WANG, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 15, 269-290.
- BUTCHER, B.A. KIM, L. JOHNSON, P.F. DENKERS, E.Y. (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B, *J. Immunol.*, 167, 2193–2201.
- CARRUTHERS, V.B. (2002) Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* *Acta. Trop.*, 81, 111–122.
- CARRUTHERS, V.B., SIBLEY, L.D. (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, 73, 114–123.

- CHOSE, O., SARDE, C.O., GERBOD, D., VISCOGLIOSE, E., ROSETO, A. (2003). Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria. *Trends Parasitol.*, 19, 559-564.
- COURRET, N., DARCHE, S., SONIGO, P., MILON, G., BUZONI-GÂTEL, D., & TARDIEUX, I. (2006) CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*, 107(1), 309-316.
- CLARK, M.R. (2011). Flippin' lipids. *Nature Immunology*. 12, 373-375.
- DAMASCENO-SÁ, J. C. (2013) Mecanismos de evasão do *Toxoplasma gondii* frente a macrófagos ativados. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.
- DAMATTA R.A., SEABRA, S.H., DEOLINDO, P., ARNHOLDT, A.C.V., MANHÃES, L. GOLDENBERG, S., DE SOUZA, W. (2007). *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiology Letters*, 266, 29–33.
- DAMATTA, R.A. SEABRA, S.H. MANHAES, L. DE SOUZA, W. (2000). Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages, *Parasitol Res.*, 86, 239–243.
- DANIEL, P.T., WIDER, T., STURM, I., SCHULZE-OSTHOFF, K. (2001). The Kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*. 15, 1022-1032.
- DE FREITAS BALANCO, J.M., MOREIRA, M.E., BONOMO, A., BOZZA, P.T., AMARANTE-MENDES, G., PIRMEZ, C., BARCINSKI, M.A. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol.*, 11, 1870–1873.
- DE SOUZA, W., MARTINS-DUARTE, E.S., LEMGRUBER, L., AYRES, L.C., ATTIAS, M., VOMMARO, R.C. (2010) Considerações atuais sobre a biologia do *Toxoplasma gondii* e sua interação com a célula hospedeira. *AANM*, 1, 31–50.
- DE SOUZA, W., ATTIAS, M. (2015) New views of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole as revealed by Helium Ion Microscopy (HIM). *Journal of Structural Biology*, 191, 76–85.
- DEOLINDO, P., TEIXEIRA-FERREIRA, A.S., MELO, E.J., ARNHOLDT, A.C., SOUZA, W., ALVES, E.W., DAMATTA, R.A. (2005). Programmed cell death in *Trypanosoma*

- cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100, 33–38.
- DEOLINDO, P., TEIXEIRA-FERREIRA, A.S., DAMATTA, R.A., ALVES, E.W. (2010). L-amino oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Toxicon*. 56, 994-995.
- DENKERS, E.Y., GAZZINELLI, R.T. (1998) Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.*, 11, 569–588.
- DOBBIN, C.A., SMITH, N.C., JOHNSON, A.M. (2002). Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide, *J Immunol.*, 169, 958–965.
- DOS REIS, G.A, BARCINSKI, M.A. (2001). Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv Parasitol.*, 49, 133-161.
- DRISCOLL, M. (1992). Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol.*, 23, 1327-1351.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 267–299.
- DUBEY, J.P., LAGO, E.G., GENNARI, S.M., SU, C., JONES, J.L. (2012) Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, 139, 1375-1424.
- DUBREMETZ, J.F., GARCIA-REGUET, N., CONSEIL, V., FOURMAUX, M.N. (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.*, 28, 1007–1013.
- ELLIOTT, J.I., SURPRENANT, A., MARELLI-BERG, F.M., COOPER, J.C., CASSADY-CAIN, R.L., WOODING, C., LINTON, K., ALEXANDER, D.R., HIGGINS, C.F. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol.*, 7, 808-816.
- ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., NAGATA, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 43– 50.
- ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. (2013) Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol.*, 1, 58-85.

- FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FREED, P.W., WESTCOTT, J.Y., HENSON, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF, *J Clin Invest.*, 101, 890–898.
- FADOK, V.A., BRATTON, D.L., HENSON, P.M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest.*, 108, 957–962.
- FERGUSON, D.J. (2009) *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 104, 133-148.
- FESUS, L. (1993). Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett.*, 338, 1-5.
- FREY, B., GAIPL, U. (2011) The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Seminars in Immunopathology*, 33, 497-516.
- FRENKEL, J.K., WEBER, R.I.V., LUNDE, K.I.N. (1960) Acute toxoplasmosis. Effective treatment with pyrimethamine, sulfadiazine, leucovorin, calcium, and yeast. *JAMA*, 173, 1471–1476.
- FRENKEL, J.K. (1973) Cytomegalovirus infection and *Toxoplasma*. *Am J Dis Child.*, 26, 860–86.
- FINLAY, B.B., COSSART, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, 276, 718–725.
- FROHLICH, K.V., MADEO, F. (2000). Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.*, 473, 6-9.
- GADELLA, B.M., HARRISON, R. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod.*, 67, 340–350.
- GAJI, R.Y., BEHNKE, M.S., LEHMANN, M.M., WHITE, M.W., CARRUTHERS, V.B. (2011) Cell cycle-dependent, intracellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression. *Molecular Microbiology*, 79,192-204.
- GARIN, J.P., PELLERAT, J., MAILLARD, WOEHRLE, R., HEZEZ. (1968) Bases theoriques de la prevention par la spiramycine de la toxoplasmose congenittale chez la femme enceinte. *Presse Med.*, 76, 2266.

- GOTTLIEB, E., VANDER HEIDEN, M.G., THOMPSON, C.B. (2000). Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.*, 20, 5680-689.
- GOTTLIEB, R.A. (2001). Mitochondria and apoptosis. *Biol.Signals Recept.*, 10, 147-61.
- GREEN, D.R., KROEMER, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-629.
- GUILLERMO, L.V., DAMATTA, R.A. (2004). Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poult Sci.*, 83, 776–782.
- GUPTA, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol.*, 22, 15-20.
- HAVERKOS, H.W. ASSESSMENT OF THERAPY FOR *TOXOPLASMA* ENCEPHALITIS (1987). The TE Study Group. *Am. J. Med.*, 82:907–914.
- HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-76.
- HUSTON, C.D., HOUP, E.R., MANN, B.J., HAHN, C.S., PETRI, JR W.A. (2000). Caspase-3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.*, 2, 617-625.
- HUYNH, M.N., FADOK, V.A., HENSON, P.M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.*, 109, 41–50.
- JONES, T.C., YEH, S., HIRSCH, J.G. (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med.*, 136, 1157–1172.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*, 26, 239– 257.
- KRAHLING, S., CALLAHAN, M.K., WILLIAMSON, P., SCHLEGEL, R.A. (1999). Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ.*, 6, 183–189.
- KROEMER, G., REED, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.*, 6, 513-16.
- LENTZ, B.R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.*, 42, 423–438.

- LYONS, R.E., JOHNSON, A.M. (1995) Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, 17, 353-35.
- LIU, X., ZOU, H., SLAUGHTER, C., WANG, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89, 175–184.
- LOEFFLER, M., KREMER, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cellular Res.*, 256, 19-26.
- LÜDER, C.G. ALGNER, M. LANG, C. BLEICHER, N. GROSS, U. (2003). Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages, *Int J Parasitol.*, 33, 833–844.
- MACMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.*, 15, 323-350.
- MADEO, F., FROHLICH, E., LIGR, M., GREY, M., SIGRIST, S.J., WOLF, D.H., FROHLICH, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 145, 757-767.
- MANGAHAS, P.M., ZHOU, Z. (2005). Clearance of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cell Dev Biol.*, 16, 295-306.
- MARIANTE, R.M., GUIMARÃES, C.A., LINDEN, R., BENCHIMOL, M. (2003). Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*. *Histochem. Cell Biol.*, 120, 129-141.
- MARIANTE, R.M., VANCINI, R.G., BENCHIMOL, M. (2005). Cell death in trichomonads: new insights. *Histochem. Cell Biol.*, 5, 1-12.
- MARTIN, S.J., REUTELINGSPERGER, C.P., MCGAHON, A.J., RADER, J.A., VAN SCHIE, R.C., LAFACE, D., GREEN, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.*, 182, 1545–1556.
- MERCIER, C., DUBREMETZ, J.F., RAUSCHER, B., LECORDIER, L., SIBLEY, L.D., CEBRON-DELAUW, M.F. (2002) Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell.*, 13, 2397–2409.

- MERCIER, C., ADJOGLE, K.D., DÄUBENER, W., DELAUW, M.F. (2005) Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexas parasites? *Int J Parasitol.*, 35, 829– 849.
- MILEWSKA-BOBULA, B., LIPKA, B., GOŁĄB, E., DEBSKI, R., MARCZYŃSKA, M., PAUL, M., PANASIUK, A., SEROCZYŃSKA, M., MAZELA, J., DUNIN-WĄSOWICZ, D. (2015) Recommended management of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women and their children. *Przegl Epidemiol.*, 69, 291-8, 403-10.
- MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O. (2004) Toxoplasmosis. *Lancet*, 363, 1965-1976.
- MORDUE, D.G., DESAI, N., DUSTIN, M., SIBLEY, L.D. (1999) Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.*, 190, 1783–1792.
- MOREIRA, M.E., DEL PORTILLO, H.A., MILDNER, R.V., BALANCO, J.M., BARCINSKI, M.A. (1996). Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania amazonensis*. *J Cell Physiol.*, 167, 305-313.
- MORISAKI, J.H., HEUSER, J.E., SIBLEY, L.D. (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Science*, 108: 2457-2464.
- NAISMITH, J.H., SPRANG, S.R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.*, 23, 74-79.
- NICHOLSON, D.W., THORNBERRY, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.*, 22, 299-306.
- NICOLLE, C., MANCEAUX, L. (1908) Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci.*, 147: 736.
- NIEL, G., VIDEAU, D. (1981) Activite de la spiramycione in vitro sur *Toxoplasma gondii*. *Reunión Inter Discipl Chimioth Antiinfect.*, 121, 8.
- PADRÃO, Jda. C., CABRAL, G.R., da SILVA, Mde. F., SEABRA, S.H., DAMATTA, R.A. (2014) *Toxoplasma gondii* infection of J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. *Parasitol Int.*, 63, 659-663
- PAPPAS, G., ROUSSOS, N., FALAGAS, M.E. (2009) Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.*, 39, 1385–1394.

- PENG, B.W., LIN, J., LIN, J.Y., JIANG, M.S., ZHANG, T. (2003). Exogenous nitric oxide induces apoptosis in *Toxoplasma gondii* tachyzoites via a calcium signal transduction pathway. *Parasitology*, 126, 541-550.
- PICOT, S., BURNOD, J., BRACCHI, V., CHUMPITAZI, B.F., AMBROISE-THOMAS, P. (1997). Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg.*, 91, 590-591.
- RADKE, J. R.; STRIEPEN, B.; GUERINI, M. N., JEROME, M. E.; ROOS, D. S.; WHITE, M. W. (2001) Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115,165-175.
- ROBERTS, A.B. (1999). TGF- β signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect.*, 1, 1265–1273.
- ROZENFELD, C., MARTINEZ, R., SEABRA, S.H., SANT'ANNA, C., GONÇALVES, J.G.R., BOZZA, M., MOURA-NETO, V., DE SOUZA, W. (2005). *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. *Am J Pathol.*, 167, 1021–1031.
- SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.*, 2, 845–858.
- SANTOS, J.M., LEBRUN, M., DAHER, W., SOLDATI, D., DUBREMETZ, J.F. (2009) Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *Int J Parasitol.*, 39, 153– 62.
- SANTOS, T.A.T., PORTES, J.A., DAMASCENO-SÁ, J.C., CALDAS, L.A, DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. SEABRA, S.H. (2011) Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS One*, 6:e27867.
- SCHWAB, J.C., BECKERS, C.J.M., JOINER, K.A. (1994) The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 509– 513.
- SEABRA, S.H., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. (2002). *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. *Exp Parasitol.*, 100, 62–70.
- SEABRA, S.H., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. (2004). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine that induces a TGF-b autocrine effect orchestrating macrophages evasion. *Biochem Biophys Res Commun.*, 324, 744–752.

- SEGAWA, K., SUZUKI, J., NAGATA, S. (2014). Flipases and scramblases in the plasma membrane. *Cell Cycle*, 13, 2990-2991.
- SHAPIRA, S. SPEIRS, K. GERSTEIN, A. CAAMANO, J. HUNTER, C.A. (2002). Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.*, 185, S66–S72.
- SIBLEY, L.D., WEIDNER, E., KRAHENBUHL, J.L. (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 315, 416–419.
- SIBLEY, L.D. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol.*, 5, 129–132, 199.
- SIBLEY, L.D., ANDREWS, N.W. (2000) Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic*, 1, 100–106.
- SIBLEY, L.D. (2003) *Toxoplasma gondii*: Perfecting an intracellular life style. *Traffic*, 4, 581–586.
- SIBLEY, L.D., KHAN, A., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL. B.M. (2010) Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 364, 2749-2761.
- SPLENDRE, A. (1908) 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.*, 3: 109-112.
- SUDHANDIRAN, G., SHAHA, C. (2003). Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem.*, 278, 25120-25132.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.*, 30, 1217-58.
- THARDIN, J. F., M'RINI, C., BERAUD, M., VANDAELE, J., FRISACH, M. F., BESSIERES, M. H., SEGUELA, J. P., AND PIPY, B. (1993). Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: Role of parasite and host cell phospholipases. *Infection and Immunity*, 61, 1432–1441.
- VAN DEN EIJNDE, S.M., VAN DEN HOFF, M.J., REUTELINGSPERGER, C.P., VAN HEERDE, W.L., HENFIING, M.E., VERMEIJ-KEERS, C., SCHUTTE, B., BORGERS, M., RAMAEKERS, F.C. (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci.*, 114, 3631–3642.

- WANDERLEY, J.L., BENJAMIN, A., REAL, F., BONOMO, A., MOREIRA, M.E., BARCINSKI, M.A. (2005). Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. *Braz J Med Biol Res.*, 38, 807-812.
- WANDERLEY, J.L., MOREIRA, M.E., BENJAMIN, A., BONOMO, A.C., BARCINSKI, M.A. (2006). Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.*, 176, 1834–1839.
- WANDERLEY, J.L., BARCINSKI, M.A. (2010). Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci.*, 67, 1653-1659.
- WANDERLEY, J. L., COSTA, J. F., BORGES, V. M., BARCINSKI, M. A. (2012). Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator. *J Parasitol Res.*, 2012, 981686.
- WANDERLEY, J. L., THORPE, P. E., BARCINSKI, M. A., SOONG, L. (2013) Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. *Parasite Immunol.*, 35, 109-119.
- WEISS, L.M., KIM, K. (2000) The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.*, 5, D391–405.
- WEISS, L.M., KIM, K. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. Perspectives and Methods. (2007) Academic Press, 1: 800.
- WEISS, L.M., KIM, K. (2013) *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan – Perspectives and Methods. London, UK: Academic press Elsevier., p. xxi.
- WELTER, Á., MINEO, J. R., DE OLIVEIRA SILVA, D. A., LOURENÇO, E. V., FERRO, E. A. V., ROQUE-BARREIRA, M. C., DA SILVA, N. M. (2007). BALB/c mice resistant to *Toxoplasma gondii* infection proved to be highly susceptible when previously infected with *Myocoptes musculinus* fur mites. *International Journal of Experimental Pathology.*, 88(5), 325–335.
- WERNER, F., JAIN, M.K., FEINBERG, M.W., SIBINGA, N.E.S., PELLACANI, A., WIESEL, P., CHIN, T., TOPPER, J.N., PERRELA, M.A., LEE, M.E. (2000). Transforming growth factor- β 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.*, 275, 36653-36658.
- WONG, S.Y., REMINGTON, J.S. (1993) Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*, 7: 299-316

WONG, S.Y., REMINGTON, J.S. (1994) Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis.*, 18, 853-861.