

ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DA AUTOFAGIA NA
INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *TOXOPLASMA GONDII* EM
CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS

JULIANA COSTA DE AZEVEDO HUZIWARA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Maio de 2016

ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DA AUTOFAGIA NA
INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *TOXOPLASMA GONDII* EM
CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS

JULIANA COSTA DE AZEVEDO HUZIWARA

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 31 de maio de 2016 por:

Prof Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (Doutor em Ciência Animal) - UFES

Profª Drª. Alba Lucínia Peixoto Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia) - UENF

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

Prof Dr. Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências) - UENF

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois em sua infinita misericórdia permitiu que esse trabalho fosse realizado, me sustentando, me fortalecendo para que cada obstáculo fosse superado e cada etapa fosse concluída.

A Dr. Renato Augusto DaMatta que desde de 2004, ao permitir que eu fizesse parte do seu grupo, me proporcionou um ambiente de crescimento profissional e pessoal. Obrigada por sua perseverança e cuidado, pois até mesmo nos momentos que eu não acreditei, me ajudou a continuar me mostrando que a vitória seria apenas o único caminho a ser alcançado.

A Júlia Resende de Oliveira por me ajudar em todos os anos que foi minha aluna de iniciação científica, pois desde a minha gravidez até o meu retorno, sua ajuda foi fundamental. Muitas vezes saber que você me esperava e que eu tinha algo para lhe ensinar era o combustível que alimentava a minha força de vontade.

Ao Dr. João Claudio Damasceno de Sá por toda a ajuda em todas as etapas desse trabalho que sempre com seu astral contagiante fazia um problemão virar uma coisinha à toa. Deu-me suporte durante minha gravidez e licença fazendo muitas vezes os experimentos pelos quais a gravidez me impossibilitava de realizar e assumindo as minhas funções durante a minha ausência. Hoje você é mais que um amigo de laboratório, é um amigo que irei carregar para o resto da vida, juntamente com a sua linda família.

A amiga Fernanda de Souza pelo suporte técnico, emocional e pessoal. Adotei-te muitas vezes quando não tinha coorientador e ao trabalhar com você reconheci muito facilmente que era uma pessoa com imenso potencial, merecedora de todas as coisas boas que está vivendo.

A todos os amigos do LBCT Gabriel Rabelo, Juliana da Cruz Padrão, Laura Miranda Motta, João Roberto Neto , Letícia Rocha, Farlen Miranda, Thiago Torres, Matheus de Freitas, Nathalia Almeida pela amizade, por estarem sempre a disposição, pela boa conversa e por ótimas ideias que as vezes brotavam da cozinha ou de um encontro informal.

Aos incríveis amigos da UEZO Professor Dr. Sergio Seabra e seus alunos Juliana Portes, Amanda Hemerly, Pedro Rodrigues, Pedro Theófilo, Nayara

Inocencio, Thiago Santos vocês sabem o quanto foram importantes para a conclusão desse trabalho. Obrigada por tudo!

Ao corpo técnico do LBCT sem exceção, pois todos foram infinitamente, prestativos, responsáveis, presentes e essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Milton Kanashiro que gentilmente permitiu que eu passasse um período em seu laboratório para a conclusão de alguns experimentos. Obrigada pelo acolhimento de todos os seus alunos, dos técnicos em especial a técnica Núbia Alencar.

Ao meu marido Eurico Huziwara por toda a paciência, dedicação, carinho, atenção, amor e fidelidade. Obrigada por toda a ajuda, todo sacrifício. Obrigada por compreender minha ausência, a nossa rotina louca, os fins de semana abdicados e por viver esse sonho junto comigo.

Ao grande e eterno amor da minha vida Manoel Azevedo Huziwara que chegou junto com o doutorado. Você me ensinou o verdadeiro sentido da vida. Não sabe o quanto me deu força e garra para continuar firme quando o mais fácil seria desistir. A sensação é de que não te vi crescer, me espanto todas as noites ao te ver dormindo. O que me consola é que todas as mães, até as normais (que não fizeram doutorado) tem a mesma sensação.

Aos meus pais Mirabel Luiz de Azevedo e Vera Lúcia Costa de Azevedo por toda dedicação, empenho e por acreditarem que eu poderia chegar até aqui. Se não fosse por vocês eu não teria vindo para Campos, permanecido e não teria chegado aonde cheguei. Nós sabemos o quanto foi difícil, pesado, mas o Senhor nos deu a vitória! Promessa cumprida pai!

Ao meu irmão Vinícius Costa de Azevedo pela amizade, o carinho e apoio durante todos esses anos.

A minha irmã Lívia Costa de Azevedo por acreditar em mim, se espelhar em mim e acreditar que eu sou muito mais do que eu realmente sou. Para ela eu sou a melhor mãe do mundo, melhor pesquisadora do mundo, melhor tudo! Obrigada por acreditar tanto em mim.

As minhas sobrinhas Melissa Domingos de Azevedo e Ana Beatriz domingos de Azevedo obrigada por vocês existirem, por todo carinho e amor.

A minha cunhada Cássia Domingos de Azevedo pela amizade e apoio durante esses quatro anos.

A amiga irmã que a UENF me deu Kelly Pinheiro dos Santos. Sabe o quanto eu te amo e o quanto nossa amizade foi fundamental para a conclusão desse trabalho, afinal alguém tinha que escutar meus desabafos, desesperos e secar as minhas lágrimas.

A amiga Barbarella Macchi, por todos os maravilhosos meses de convívio. Você foi um verdadeiro presente para todos nós.

Agradeço a FAPERJ, CNPq, UENF e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
1.1. Toxoplasmose	2
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	4
1.2.1. Infecção oral por <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.3. Células epiteliais intestinais	7
1.3.1. Mecanismos de defesa das células epiteliais intestinais frente ao <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.4. Óxido nítrico sintase induzida	10
1.4.1. Mecanismos de ação e produção de óxido nítrico.	10
1.4.2. Óxido nítrico como mecanismo microbicida	12
1.4.3. Mecanismos de inibição de iNOS de macrófago por <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.4.4. A produção de óxido nítrico pelas células epiteliais intestinais	14
1.5. Autofagia.....	15
1.5.1. Mecanismos autofágicos desenvolvidos naturalmente pelas células	15
1.5.2. Autofagia como mecanismo microbicida	18
1.5.3. Autofagia em células epiteliais intestinais	21
2. Justificativa	22
3. Objetivo	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. Materiais e métodos	24
4.1. Manutenção da IEC-6.....	24
4.2. Obtenção de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	24
4.3. Obtenção de cistos teciduais de <i>Toxoplasma gondii</i>	24

4.4. Ativação da IEC-6 com lipopolissacarídeo e diferentes concentrações de Interferon gamma.	25
4.5. Interação <i>Toxoplasma gondii</i> com IEC-6.....	25
4.6. Avaliação de nitrito	25
4.7. Avaliação do crescimento de <i>Toxoplasma gondii</i> em IEC-6.....	26
4.8. Imunolocalização de iNOS, vesículas autofágicas e <i>Toxoplasma gondii</i> em IEC-6.....	26
4.9. Curva de sobrevivência de animais CCR2 ^{-/-}	27
4.10. Cultura de explantes de íleo de animais CCR2 ^{-/-}	27
5. Resultados	28
5.1. IEC-6 ativadas com IFN-γ produziram quantidades significativas de óxido nítrico e expressaram a enzima óxido nítrico sintase induzida	28
5.2. Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> inibiu a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida e produção de óxido nítrico em IEC-6.	30
5.3. Expressão citoplasmática e da degradação da enzima óxido nítrico sintase induzida em IEC-6 após infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	33
5.4. Ativação das IEC-6 com interferon gamma suprimiu a porcentagem de células infectadas com <i>T. gondii</i>	37
5.5. Inibição do desenvolvimento de <i>Toxoplasma gondii</i> em IEC-6 envolveu o óxido nítrico	37
5.6. Interferon gamma induziu aumento de vesículas autofágicas em IEC-6.	40
5.7. Curva de sobrevivência de animais CCR2 ^{-/-}	41
5.8. Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida no íleo de animais CCR2 ^{-/-}	42
5.9. Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida em enterócitos de explantes de íleo de camundongos CCR2 ^{-/-} infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> foi inibida após infecção com taquizoítas desse parasito.	44
6. Discussão	46
7. Conclusões	52
8. Referências Bibliográficas	53

Lista de Abreviaturas

ATGs	genes autofágicos
DC.....	Célula dendrítica
DMEM.....	<i>Dubelcco's modified Eagle medium</i>
iNOS.....	óxido nítrico sintase induzida
IEC.....	Célula epitelial intestinal
IFN- γ	Interferon gamma
IEC-6.....	Linhagem de célula epitelial intestinal-6
IL.....	Interleucina
LPS.....	Lipopolissacarídeo
NO.....	Óxido nítrico
NOS.....	óxido nítrico sintase
SFB	Soro fetal bovino
VP.....	Vacúolo parasitóforo

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura 2: Esquema da ultraestrutura de <i>Toxoplasma gondii</i> formas taquizoíto e bradizoíto	6
Figura 3: Esquema de formação de autofagolisossomos	16
Figura 4: O papel da autofagia em <i>Toxoplasma gondii</i> na interação com células fagocíticas profissionais	20
Figura 5: Efeito da ativação com interferon-gamma (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) em IEC-6 por 24 h na produção de nitrito (μ M)	28
Figura 6: Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas ou não após 24 h de cultivo imunomarcadas com anti-iNOS (verde).	29
Figura 7: Maiores concentrações de Interferon-gamma induziram maior produção de nitrito (μ M) em células epiteliais intestinais após 24 h de ativação.....	30
Figura 8: Células epiteliais intestinais ativadas com interferon-gamma infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> produziram menos nitrito (μ M) com ambas as cepas após 24 h, mas apenas a cepa RH manteve a inibição após 48 h.....	31
Figura 9: Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> de duas cepas RH e ME-49 em células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas com interferon-gamma.....	32
Figura 10: Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas por 24 h com interferon-gamma imunomarcadas com anti-iNOS (verde) montadas com Prolongold com DAPI (azul).....	34
Figura 11: Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas ou não por 24 h imunomarcadas com anti-iNOS (verde) montadas com Prolongold sem DAPI.....	35
Figura 12: Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas por 24 h com interferon-gamma imunomarcadas com anti-iNOS (verde) e anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (laranja) montadas com Prolongold sem DAPI.	36

Figura 13: Desenvolvimento de <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa RH, em células epiteliais intestinais ativadas ou não com interferon-gamma.	37
Figura 14: Desenvolvimento de <i>Toxoplasma gondii</i> cepa RH em IEC-6 ativadas com interferon-gamma, tratadas ou não com o inibidor da oxido nítrico sintase induzida, nitro-L-arginina.	39
Figura 15: Células epiteliais intestinais (IEC-6) não ativadas e ativadas com interferon-gamma (IFN- γ) imunomarcadas com anti-LC3 (verde), anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (laranja) e núcleo marcado com DAPI (azul)	41
Figura 16: Sobrevivência de animais CCR2 ^{-/-} infectados com 5 e 10 cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> , cepa ME-49.	42
Figura 17: Expressão de iNOS no íleo de camundongos CCR2 ^{-/-} infectados oralmente com <i>Toxoplasma gondii</i>	43
Figura 18: Cultura de explantes de íleo de camundongos CCR2 ^{-/-} infectados oralmente por <i>Toxoplasma gondii</i> por 7 dias.....	45

Resumo

A toxoplasmose é doença de abrangência mundial causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. A infecção natural por *T. gondii* é oral. No trato gastrointestinal esse parasito, necessariamente, infecta as células epiteliais intestinais (IEC), mas não se multiplica nelas sendo essas células as últimas a serem destruídas durante o processo inflamatório agudo que pode acometer os hospedeiros. A ativação da linhagem celular IEC-6 pelo interferon-gama (IFN- γ) *in vitro* inibe a proliferação de *T. gondii* via redução de ferro intracelular. No entanto, outros mecanismos microbicidas podem estar envolvidos nesse controle. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a produção de óxido nítrico (NO) e a autofagia estão envolvidas no processo de inibição da proliferação de *T. gondii* em IEC-6. Vimos que IEC-6 ativada com IFN- γ expressaram NO sintase induzida (iNOS) e produziram NO. Verificamos que a infecção por *T. gondii* foi capaz de inibir a expressão da iNOS e consequentemente a produção de NO. IEC-6 ativadas com IFN- γ inibiram crescimento de *T. gondii* e Nitro-L-Arginina (inibidor de iNOS) reverteu essa inibição, indicando que NO é um dos mecanismos envolvidos. Observamos em IEC-6 ativadas com IFN- γ o aumento da expressão de vesículas autofágicas que se organizaram preferencialmente ao redor dos parasitos, sugerindo que a autofagia pode ser um outro mecanismo envolvido no controle do crescimento do parasito. Por últimos verificamos se o processo de inibição da expressão da iNOS também ocorreria *ex vivo* em IEC do íleo de camundongos. Camundongos CCR2^{-/-} foram infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e a expressão de iNOS nas IEC do íleo confirmada. A infecção *in vitro* com *T. gondii* de explantes de íleo desses animais resultou na menor expressão de iNOS das IEC. Concluímos que a produção de NO e a autofagia são dois mecanismos relevantes no processo de inibição do crescimento parasitário em IEC-6 ativadas pelo IFN- γ . Ademais, sugerimos que a reduzida expressão de iNOS nas IEC do íleo após a infecção por *T. gondii* pode ter relevância no sucesso do parasito na infecção *in vivo*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, célula epitelial intestinal, autofagia, óxido nítrico.

Abstract

Toxoplasmosis is a worldwide disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. The *T. gondii* natural infection is oral. At the gastrointestinal tract this parasite necessarily infects intestinal epithelial cells (IEC), but do not multiply within them being these cells the last ones to be destroyed during the acute inflammatory process that can affect the host. The activation of the cell line IEC-6 by interferon-gamma (IFN- γ) *in vitro* inhibits the proliferation of *T. gondii* via reduction of intracellular iron. However, other microbicidal mechanisms may be involved in this control. The aim of this study was to evaluate if the production of nitric oxide (NO) and autophagy were involved in the proliferation inhibition process of *T. gondii* in IEC-6. We have seen that IEC-6 activated with IFN- γ expressed induced NO synthase (iNOS) and produced NO. We found that the *T. gondii* infection was capable of inhibiting the expression of iNOS and therefore of the NO production. IEC-6 activated with IFN- γ inhibited the growth of *T. gondii* and Nitro-L-Arginine (iNOS inhibitor) reversed this inhibition, indicating that NO is one of the mechanisms involved. We observed that IEC-6 activated with IFN- γ increased expression of autophagic vesicles which were preferably arranged around the parasites, suggesting that autophagy may be another mechanism involved in the control of parasite growth. Finally we checked whether the process of inhibition of iNOS expression also occur *ex vivo* in IEC of the ileum of mice. CCR2^{-/-} mice were orally infected with *T. gondii* cysts and the expression of iNOS in IEC of the ileum confirmed. The *in vitro* infection with *T. gondii* of ileum explants of these animals resulted in lower expression of iNOS of IEC. We conclude that the production of NO and autophagy are two relevant mechanisms in the process of inhibition of parasite growth in IEC-6 activated by IFN- γ . Furthermore, we suggest that the reduced expression of iNOS in IEC of the ileum after infection with *T. gondii* may have relevance in the success of the parasite during *in vivo* infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, intestinal epithelial cell, autophagy, nitric oxide.

1. Introdução

Toxoplasma gondii é protozoário patogênico, do grupo dos coccídeos, membro do filo apicomplexa que engloba parasitos intracelulares caracterizados por serem células polarizadas, contendo organelas secretoras exclusivas (róptrias e micronemas), apicoplasto e complexo apical (Francia *et al.*, 2016). Esse parasito é o agente etiológico da toxoplasmose, zoonose de importância médica e veterinária (Mimica *et al.*, 2015).

A via natural de infecção de *T. gondii* é a oral. A transmissão pela via oral implica em primeiro momento na invasão das células epiteliais intestinais (IEC). A função principal desse tipo celular é de atuar como barreira fisiológica e imunológica, separando o conteúdo luminal, repleto de antígenos alimentares e microrganismo, das camadas de tecidos que compõem o ambiente interno (Cader e Kaser, 2013).

Em razão da sua localização, pode-se dizer que as IEC representam a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos presentes no ambiente do lúmen intestinal (Cohen e Denkers, 2014). Como consequência a exposição a diferentes patógenos, as IEC desenvolveram mecanismos complementares a barreira fisiológica, as quais atuam reduzindo os riscos de invasão por microrganismos (Cohen e Denkers, 2014). Um desses mecanismos é a produção de óxido nítrico (NO) (Buzzoni-Gatel e Werts, 2006) que atua frente a infecções provocadas por diferentes patógenos que infectam as células intestinais.

O NO está envolvido em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos (Keklikoglu *et al.*, 2008). O NO é um produto da enzima NO sintase (NOS), que catalisa a conversão de arginina e oxigênio em NO e citrulina. Inúmeras células apresentam a capacidade de produzir NO. Estudos mostram que esse gás possui atividade microbicida podendo inibir a proliferação e até mesmo matar determinados microrganismos (Flores-Villegas *et al.*, 2015). Entretanto, *T. gondii* diminui parcialmente a expressão de NOS induzida (iNOS) e conseqüentemente a produção de NO (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016). Esse mecanismo já é bem caracterizado em macrófagos murinos (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013), de galinhas (Guillermo e DaMatta, 2004) e de avestruz (Miranda *et al.*, 2016), porém ainda não demonstrado em IEC.

A autofagia vem sendo estudada desde a década de 1950 (Klionsky, 2007). Esse processo de auto-degradação de componentes celulares é regulada em resposta a estresses extra e intracelulares e a infecções causadas por patógenos (He e Klionsky, 2009). Além disso, funciona como uma resposta adaptativa em condições em que há privação de nutrientes (He e Klionsky, 2008). Nesse processo formam-se vesículas com dupla membrana (derivadas do retículo endoplasmático), denominados autofagossomos, que engolfam proteínas, organelas danificadas ou não ou mesmo patógenos intracelulares. Em seguida os autofagossomos fusionam-se com lisossomos e o conteúdo é degradado. As moléculas resultantes são recicladas para o citosol e reutilizadas para obtenção de energia (Yorimitsu e Klionsky, 2005). Estudos têm demonstrado que a autofagia induzida pelo IFN- γ atua contra *T. gondii* (Bradfute *et al.*, 2013).

Sabendo que as IEC atuam como células de barreira tanto física como imunológica, investigamos quais os possíveis mecanismos microbicidas usados por essas células no controle de *T. gondii*, assim como esse parasito lida com esses mecanismos. Os alvos de investigação foram os mecanismos envolvendo produção de NO e autofagia pelas IEC após infecção com *T. gondii*.

1.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença infecciosa que acomete animais homeotérmicos (Montoya e Liesenfeld, 2004; Halonen e Weiss, 2013). Essa doença é causada pelo agente etiológico *T. gondii* e a contaminação dos hospedeiros ocorre por ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos teciduais ou água e alimentos contaminados com oocistos desse parasito (Tenter *et al.*, 2000). Esse parasito apresenta ampla distribuição geográfica se comportando como um agente com alta infectividade e baixa patogenicidade (Holland *et al.*, 1999).

Essa doença pode ser adquirida ou pode ocorrer sob forma congênita, (Guclu *et al.*, 2007). A toxoplasmose adquirida é a forma mais comum de contaminação por *T. gondii*, na qual o indivíduo infecta-se após ingerir alimentos ou água contaminada, por transfusão de sangue, ou ainda ao se submeter à transplante de órgãos (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2010). Para que a toxoplasmose vertical ocorra, é necessário que a infecção por *T. gondii* aconteça durante a gestação. O risco de transmissão é de 15 % no primeiro trimestre, de

25 % no segundo trimestre e 65 % no terceiro trimestre. A infecção poderá resultar em aborto, em patologias neurológicas, e neuroconjuntivas, como a coriorretinite (Jones *et al.*, 2001).

O diagnóstico da toxoplasmose é feito através de bio-ensaio histopatológico, e exame sorológico incluindo testes de ELISA (Habibi *et al.*, 2012). Dados epidemiológicos indicam que cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo são soropositiva para *T. gondii*, não significando que esses indivíduos apresentem manifestações clínicas. Os índices epidemiológicos da doença podem variar de acordo com os hábitos da população local (Frenkel *et al.*, 1991; Amorim *et al.*, 2004; Kijlstra e Jongert, 2008).

Estudos recentes analisaram a prevalência, espectro clínico, epidemiologia molecular, e o controle de *T. gondii* e verificou-se que no Brasil há uma elevada taxa de infecção em seres humanos, onde 50% das crianças do ensino fundamental e em torno de 50-80% das mulheres em idade fértil são soropositivas para *T. gondii*. Além disso, o estudo demonstrou que é alto o índice de crianças infectadas congenitamente (Dubey *et al.*, 2012). Esse protozoário é um dos mais abundantes parasitos eucarióticos em seres humanos (Tenter *et al.*, 2000) apresentando soroprevalência mínima de 30% podendo chegar a 80% em certas populações como em Campos dos Goytacazes, município do Estado do Rio de Janeiro, onde foi detectado alta soroprevalência em grupos de baixo status socioeconômico (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que a soroprevalência em animais é alta o que indica que há importante circulação de *T. gondii*. Tal estudo revela que há a necessidade de estratégias integradas para prevenir e controlar essas infecções em animais, visando a redução da toxoplasmose em humanos (Gharekhani, 2014).

Normalmente o curso da toxoplasmose é assintomática em 90% dos pacientes que possuem sorologia positiva para *T. gondii* (Abhilash *et al.*, 2013). Quando essa zoonose é sintomática, pode provocar febre, manchas pelo corpo, cansaço, dores no corpo, linfonodomegalia, dificuldades para enxergar, podendo evoluir para cegueira e lesões na retina levando indivíduos imunossuprimidos como pacientes portadores de neoplasias ou pela síndrome da imunodeficiência adquirida à morte (Machala *et al.*, 2015).

1.2. *Toxoplasma gondii*

T. gondii é o mais bem sucedido protozoário parasito intracelular obrigatório capaz de infectar ampla quantidade de hospedeiros vertebrados homeotérmicos, incluindo os seres humanos e animais de importância econômica (Denkers e Gazzinelli, 1998; Dubey, 1998; Sibley, 2003).

O ciclo de vida de *T. gondii* foi completamente elucidado a cerca de 60 anos (Ferguson, 2009). Seu ciclo de vida é complexo e constituído de uma fase sexuada que ocorre somente nas IEC de felinos, seu hospedeiro definitivo; e um ciclo assexuado que ocorre nas células de diferentes tecidos dos hospedeiros intermediários e definitivo (Dubey, 2004). Esses hospedeiros, incluindo os humanos, podem ser infectados pela ingestão de oocistos esporulados contendo esporozitos que atravessam as IEC transformando-se em taquizoitos que infectarão as células da lâmina própria (Dubey *et al.*, 1998). Diferentemente dos outros parasitos apicomplexas, *T. gondii* pode ser transmitido entre os hospedeiros intermediários por uma transmissão vertical (mãe-feto) ou horizontal (carnivorismo) (Blader e Saeij, 2009). Seu ciclo se sustenta na sua capacidade de estabelecer infecção crônica de longa duração em hospedeiros intermediários imunocompetentes a fim de maximizar a probabilidade de transferência ao hospedeiro definitivo (Figura 1).

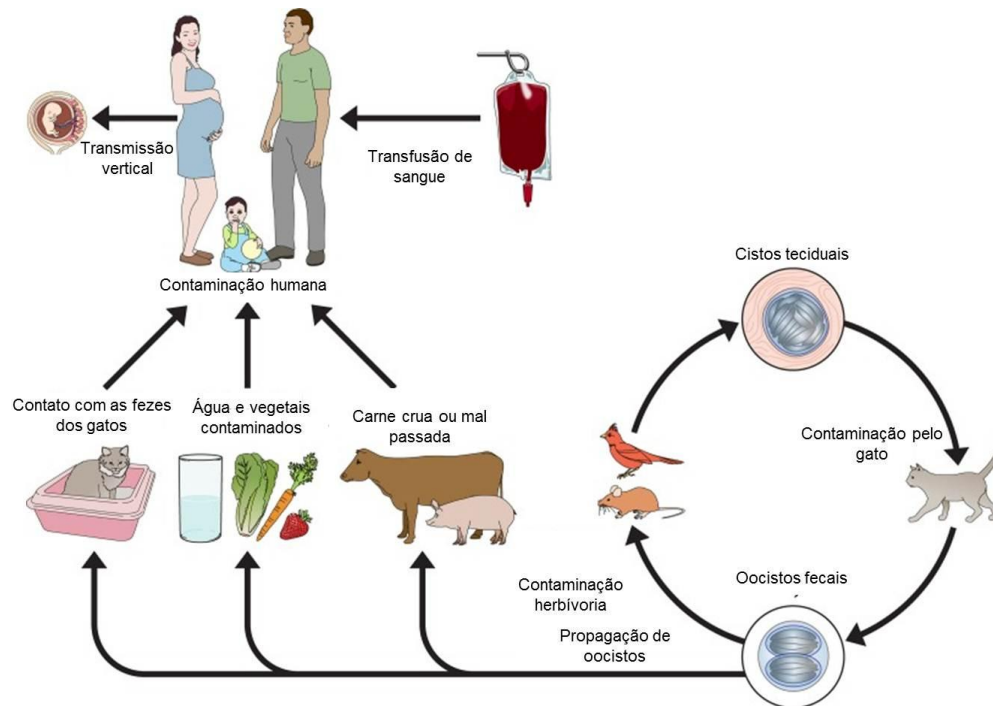


Figura 1: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose congênita ocorre quando a mãe se contamina ainda no período gestacional, através da ingestão de alimentos contendo cistos ou oocistos de *T. gondii*. Qualquer indivíduo pode se contaminar também na idade adulta, com a ingestão de alimentos contaminados com cistos ou oocistos, transfusão de sangue e transplantes de órgãos, caracterizando a toxoplasmose adquirida. Somente no seu hospedeiro definitivo (felinos), poderá ocorrer o ciclo sexuado desse parasito com a eliminação de oocisto através das fezes desses animais. Esses oocistos no ambiente podem não somente contaminar os seres humanos mais também diversos animais homeotérmicos. Traduzido de Esch e Petersen (2013).

T. gondii pode existir em duas formas, bradizoítos e taquizoítos, que se interconvertem (Figura 2). Os bradizoítos possuem crescimento lento, e se encontram nos cistos teciduais (Tenter *et al.*, 2000). Infecções com cistos, contendo bradizoítos, ou com oocistos, contendo esporozoítos, ocorrem após a ingestão de água ou alimentos contaminados. Após a ingestão, a parede dos cistos ou dos oocistos é digerida pelas enzimas gástricas e os bradizoítos ou esporozoítos resistentes a peptidases gástricas são liberados e invadem as IEC do intestino delgado (Speer e Dubey, 1998; Blader e Saeij, 2009;).

Os bradizoítos ou esporozoítos atravessam as IEC, infectam diferentes tipos celulares na lâmina própria do intestino delgado e se convertem em taquizoítos (Lyons *et al.*, 2002). Essa forma possui rápido crescimento e podem infectar muitas células nucleadas, se replicando no interior do vacúolo parasitóforo (VP) de onde irá sair e infectar células vizinhas. Nesse processo, células infectadas se desprendem dos tecidos e disseminam a infecção a outros

tecidos (Da Gama *et al.*, 2004; Seipel *et al.*, 2009; Weidner e Barragan, 2014). Durante esse processo, a destruição tecidual causada pelos taquizoítos e algumas de suas próprias moléculas ativam a respostas imune no hospedeiro que controla o crescimento dos parasitos. Alguns taquizoítos, porém, escapam da destruição se interconvertendo a bradizoítos em tecidos distantes do intestino delgado e imunoprevilegiados (Blader e Saeij, 2009).

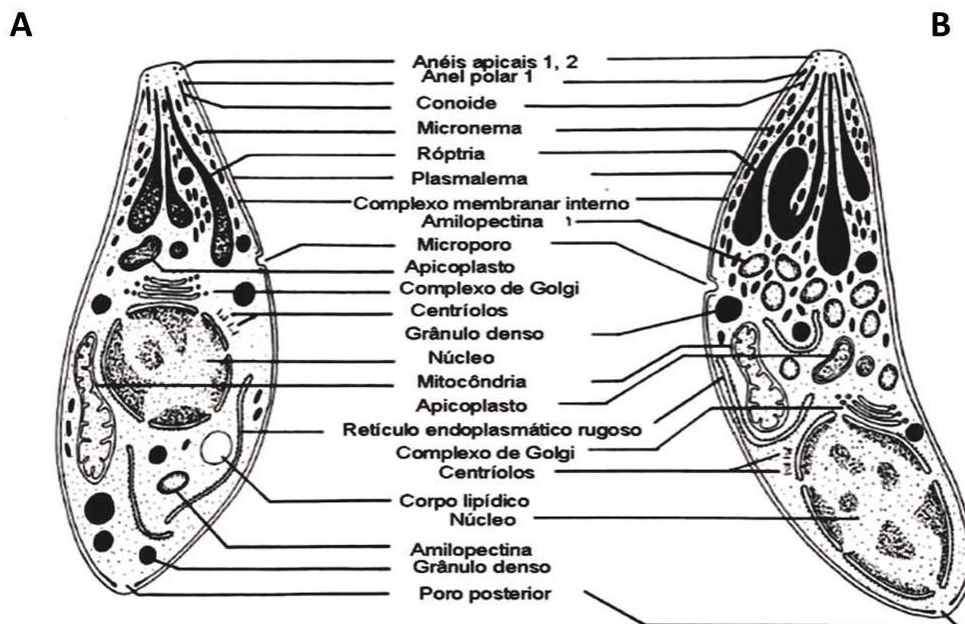


Figura 2: Esquema da ultraestrutura de *Toxoplasma gondii*: formas taquizoíta e bradizoíta. Figura A representa a estrutura de *T. gondii* na forma taquizoíta. A figura B mostra a estrutura do parasito em sua forma bradizoíta. Traduzido de Dubey e Speer (1998).

1.2.1. Infecção oral por *Toxoplasma gondii*

Com a ingestão de algum alimento, ou água contaminada com *T. gondii*, esse parasito passa pelo trato gastrointestinal e as primeiras células do hospedeiro que terão contato direto com *T. gondii* são as IEC (Buzoni-Gatel *et al.*, 2006). O sistema de defesa da mucosa é complexo e envolve vários tipos celulares incluindo uma única camada celular de IEC que separa as células da lâmina própria da microbiota e de antígenos contidos no lúmen do intestino (Mowat, 2003).

A infecção com *T. gondii* é caracterizada por uma fase aguda em que os parasitos ingeridos atravessam as IEC, se dividem amplamente como taquizoítos em células da lâmina própria causando lise celular e se espalham pelos tecidos

dentro de células infectadas (Buzoni-Gatel *et al.*, 2006). *T. gondii* estimula a imunidade mediada por células, sendo a produção de interferon-gama (IFN- γ) chave para essa resposta. No início da infecção o parasito desencadeia a produção de interleucina (IL) 12 que por sua vez atua na indução de fator de necrose tumoral alfa para induzir a produção de IFN- γ pelas células *Natural Killer* (Sher *et al.*, 1993; Denkers e Gazzinelli 1998). Embora estudos feitos com macrófagos e neutrófilos demonstrem que esses produzem IL-12 em resposta ao *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1993; Bliss *et al.*, 1999) estudos com camundongos *Knockout* para células dendríticas (DC), mostram que essas são a principal fonte de IL-12 *in vivo* (Liu *et al.*, 2006). Em camundongos, a produção de IL-12 e a resistência a infecção é altamente dependente de MyD88, demonstrando que o reconhecimento imunológico é dependente de receptores do tipo Toll (Scanga, 2002; Hou *et al.*, 2011). Também existem claras evidências de que o IFN- γ induz a morte de parasitos em macrófagos humanos, envolvendo sinalização de CD40 e autofagia (Andrade *et al.*, 2006).

A patologia causada pela infecção oral de *T. gondii* observada no intestino de camundongos é semelhante ao que ocorre em humanos que sofrem com as doenças inflamatórias intestinais (*Inflammatory Bowel Disease*) (Egan *et al.*, 2012). O desenvolvimento da lesão intestinal em camundongos se mostra diretamente dependente da infecção por via oral, visto que a infecção peritoneal não provoca tal lesão (Egan *et al.*, 2012). Essa lesão é localizada na parte terminal do intestino delgado, íleo, e causada por um processo inflamatório devido a grande carga parasitária (Liesenfeld, 2002).

1.3. Células epiteliais intestinais

O principal tipo de célula diferenciada encontrada no intestino delgado são as IEC (também conhecidas como enterócitos). As IEC são células altamente polarizadas proporcionado por seu contato com a membrana basal e as células adjacentes (Simon-Assmann *et al.*, 2007). A lâmina basal é não lipídica, contínua, cujos constituintes primários incluem laminina, proteoglicanos de sulfato de heparina, e colágeno do tipo IV (Timpl, 1989). A parte apical das IEC é composta por microvilosidades ricas em transportadores e hidrolases, responsáveis por funções de absorção e digestão. Expressão de hidrolases como lactase,

sacarase, isomaltase e dipeptidilpeptase IV são indicadores de diferenciação celular intestinal *in vitro* (Neutra e Louvard, 1989).

As IEC da mucosa intestinal desempenham um papel na homeostase dos organismos (Bloushtain-Qimron *et al.*, 2009; Mastrogiannaki *et al.*, 2009). Dependendo de sua localização no trato intestinal, elas não só desempenham papel central em funções como absorção e secreção, mas também possuem a capacidade de proteger o organismo de vários patógenos e toxinas encontradas em condições normais do intestino, proporcionando uma barreira eficaz aos antígenos do conteúdo intestinal (Podolsky *et al.*, 2009).

A função de barreira epitelial depende de um grau bastante elevado de organização intracelular (Madara, 1995). A integridade estrutural do interior de cada IEC é mantida pela presença de uma complexa rede de microfilamentos de citoesqueleto (Pitman e Blumberg, 2000). Esses filamentos variam na sua composição e localização. Os filamentos de actina, por exemplo, formam um anel na parte apical e basolateral dos pólos das células, enquanto que filamentos intermediários estão mais espalhados por todo o citoplasma e fazem a ancoragem em pontos da membrana plasmática pelas junções denominadas desmossomos (Rodriguez-Boulan *et al.*, 1992). Essas estruturas são essenciais para a manutenção da polaridade e no suporte dos pontos de contato célula-célula (Pitman e Blumberg, 2000). A junção de oclusão (*tight*) garante a interação célula-célula sendo parte importante da barreira física contra a penetração de microrganismos e antígenos intestinais a lamina própria (Buzoni-Gatel *et al.*, 2006).

Devido a complexidade celular do intestino, com a possibilidade de interação entre os diferentes tipos celulares, existe grande dificuldade para estudos dessas células *in vivo*. A capacidade de se cultivar IEC *in vitro* foi de grande importância para investigar as propriedades dessas células (Quaroni *et al.*, 1979). Esses autores reportaram o estabelecimento por longo tempo de culturas de IEC de rato e nomearam de "IEC". Essas células foram derivadas de diferentes regiões do trato intestinal obtidas de explantes mantidos em meio contendo colagenases para redução do crescimento de células mesenquimais. Essas linhagens de células foram exclusivamente caracterizadas e tornaram-se um modelo amplamente utilizado para células da cripta em cultura de célula (Quaroni *et al.*, 1999). Esse tipo celular é bem estudado *in vitro*, pois podem ser

reconstruídos modelos de lesões nas monocamadas celulares (Rao *et al.*, 2008; Silver *et al.*, 2012).

1.3.1. Mecanismos de defesa das células epiteliais intestinais frente ao *Toxoplasma gondii*

IEC são as primeiras células a entrarem em contato com *T. gondii*, quando ocorre a contaminação por via oral, característica da toxoplasmose adquirida. Essas células necessitam manter a homeostase do ambiente intestinal, fazendo com que esse parasito não o perturbe.

As junções de oclusão promovem uma espécie de barreira física contra *T. gondii*. Porém, apesar dessa defesa o parasito consegue cruzar ativamente essas monocamadas de células, e essa capacidade está diretamente ligada a sua motilidade que tem correlação positiva com sua virulência (Barragan e Sibley, 2002). No momento em que o parasito ultrapassa essa barreira celular, a integridade da célula hospedeira não é alterada (Speer e Dubey, 1998).

IEC possuem a capacidade de atuarem como imunócitos por regularem positivamente marcadores de ativação, associados a apresentação de antígenos. A primeira linha de defesa ocorre pela ação das alfa defensinas secretadas pelas células de Paneth no intestino. Essas moléculas efetoras possuem um efeito limitado contra *T. gondii*, porém promovem o início de resposta protetiva do tipo Th1 contra esse parasito (Foureau *et al.*, 2010).

Dimier e Bout (1993) reportaram que quando as IEC-6 (linhagem celular de IEC) são infectadas por *T. gondii* e ativadas com IFN- γ a replicação do parasito é inibida. Demonstraram ainda que a inibição parasitária pela indução de IFN- γ também ocorre com diferentes linhagens de IEC, onde a inibição foi relatada como dose dependente de IFN- γ e não relacionada aos mecanismos microbicidas baseados em espécies reativas de oxigênio, dependente de L-arginina, síntese de intermediários reativos de oxigênio, ou produção de indoleamina 2,3 desidrogenase que degrada o triptofano, fazendo com que a célula morra pela falta desse aminoácido (Dimier e Bout, 1997). Estudos posteriores demonstraram que o IFN- γ inibe o ferro intracelular levando a inibição da replicação de *T. gondii* (Dimier e Bout, 1998). Outros possíveis mecanismos foram avaliados, porém nenhum teve efeito na inibição do parasito, entre eles a produção de NO dependente de L-arginina semelhante aos mecanismos que ocorrem em

macrófagos (Dimier e Bout, 1998). O NO é uma molécula de sinalização que funciona também como agente microbicida adicional para controlar e remover parasitos intestinais, sendo secretado pelas células do intestino (Gookin *et al.*, 2006).

O mecanismo demonstrado por Dimier e Bout (1998), foi um dos últimos, sendo a falta de ferro a principal causa da morte de *T. gondii*, quando essas células são ativadas com IFN- γ . Mais recentemente, outros mecanismos vêm sendo relacionados a inibição do crescimento de *T. gondii* como a produção de NO (Takács *et al.*, 2012) e autofagia (Souto *et al.*, 2016).

1.4. Óxido nítrico sintase induzida

1.4.1. Mecanismos de ação e produção de óxido nítrico.

A estrutura molecular do NO é composta por oxigênio e nitrogênio, unidos por uma ligação dupla (Kroncke *et al.*, 1997). NO é uma molécula de meia vida curta que tem importante papel em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos (Keklikoglu *et al.*, 2008). NO foi primeiramente descrito como fator relaxante derivado do endotélio (do inglês *endothelium-derived relaxing factor*): um potente vasodilatador de curta duração. Estudos subsequentes revelaram seu papel como regulador de fluxo sanguíneo, capaz de induzir variedade de processos fisiológicos, incluindo homeostase tecidual, como neurotransmissor e em processos inflamatórios (Chang *et al.*, 2004).

NOS catalisa a reação entre arginina e oxigênio, com consumo de 1,5 mol de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para 1 mol de NO produzido. Citrulina e água também são produzidas durante a reação (Chokshi *et al.*, 2008). NO é um produto da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina pela enzima NOS na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Chokshi *et al.*, 2008). Existem três isoformas de NOS, cada uma codificada por diferentes genes. Duas dessas isoformas, NOS endotelial (eNOS/NOS 3) e neuronal (nNOS/NOS 1) são expressas constitutivamente em dois níveis, possuem domínios de ligação a calmodulina em uma forma cálcio dependente e produzem concentrações picomolares de NO (Mayer, 1998). A terceira isoforma, iNOS (NOS 2) é cálcio independente, se ligando com alta afinidade a calmodulina independente da presença do cálcio (Spratt *et al.*, 2007). A iNOS não é expressa

sob condições normais, mais é induzida durante a inflamação. Essa isoforma produz grandes quantidades de NO (na ordem de micromolar) por um limitado período de tempo.

iNOS foi originalmente descrita como uma enzima expressa por macrófagos ativados, gerando NO a partir de L-arginina, e assim contribuindo para controle da replicação ou eliminação dos patógenos microbianos intracelulares (Bogdan *et al.*, 2000). Porém, sabe-se que a geração de NO é uma característica genuína de células do sistema imune como DC, *Natural Killer*, mastócitos e células fagocíticas que incluem monócitos, macrófagos, microglia, células de Kupfer, eosinófilos e neutrófilos. Além disso, o NO também é sintetizado por células que estão envolvidas em reações imunes como as células endoteliais, células epiteliais, células vasculares da musculatura lisa, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwann (Bogdan, 2001).

iNOS é positivamente ou negativamente regulada pelo contato célula-célula (via adesão e moléculas coestimulatórias), citocinas, complexos imune e produtos microbianos e virais (MacMicking *et al.*, 1997; Bogdan, 2000). Embora o IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS) de origem bacteriana sejam as moléculas mais estudadas e descritas como mediadores indutores de iNOS, novos mediadores estão sendo descobertos, como a combinação de IL-12 e IL-18 que induzem iNOS em várias populações de macrófagos através de um mecanismo mediado por produção autócrina de IFN- γ (Frucht *et al.*, 2001).

O papel efetor como antiparasitário do NO e da iNOS *in vivo* e *in vitro* foi demonstrado contra grande número de parasitos que incluem *Plasmodium* spp. (Motard *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1996), *Leishmania* spp. (Dayakar *et al.*, 2015), *Schistosoma* sp (Guglielmo *et al.*, 2014), *T. gondii* (Adams *et al.*, 1990), *Trypanosoma brucei* (Guilliams *et al.*, 2009), tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Vespa *et al.*, 1994). A produção de NO é comumente associada com a regulação de infecções provocadas por protozoários (Brunet, 2001). O NO pode exercer citotoxicidade através de um número diferente de mecanismos (Lyons, 1995), podendo matar diretamente taquizoítos de *T. gondii* por inibição de enzimas mitocondriais e enzimas nucleares essenciais (Brunet, 2001).

Os parasitos podem fazer com que células do sistema imunológico induzam citocinas como IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa e IL-1 beta. Produtos

de patógenos como glicosilfosfatidilinositol podem estimular a expressão de iNOS em células hospedeiras infectadas (Tachado *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2000).

1.4.2. Óxido nítrico como mecanismo microbicida

NO pode reagir com elementos estruturais da maquinaria de replicação celular, como ácidos nucleicos, enzimas metabólicas, ou com moléculas associadas à virulência de infecção de alguns patógenos que é a base para seu efeito direto como molécula antimicrobiana (Fang, 2004; Bagdan, 2011). Embora a ação do NO não seja capaz de atacar as múltiplas estruturas de patógenos infecciosos ao mesmo tempo, ocorre à ruptura de uma estrutura alvo, única, que possui forte efeito antimicrobiano que é a inativação de metaloproteínas mediada por esse gás (Jones-Carson *et al.*, 2008).

NO vai atuar nas células como agente microbicida, de forma direta e indireta. A atividade direta do NO tem sido muito bem caracterizada em estudos feitos com macrófagos (Nathan 2000; Bogdan 2000; 2001), mas outras células como DC, neutrófilos, eosinófilos e hepatócitos, também possuem ação contra microrganismos pela produção de NO (Bogdan, 2000; Feng e Walker, 2000; Jyoti *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015).

Ao longo dos anos, tem sido visto a ação de NO, em diferentes microrganismos como *Salmonella enterica* um sorotipo de *Salmonella typhimurium*. A inativação de NO leva a desativação de importantes enzimas do ciclo de Krebs, levando à redução da síntese de lisina e metionina, que são dependentes de Acetil-coenzima A (Richardson *et al.*, 2011).

A detecção de iNOS em granulomas de seres humanos e macacos, infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, também é um indicativo para o papel antimicrobiano do NO durante a tuberculose aguda e latente (Mattila *et al.*, 2013).

O efeito antimicrobiano indireto tem sido amplamente demonstrado, como por exemplo, em estudos feitos com macrófagos da medula óssea de rato, no qual o NO gerado por iNOS, demonstrou levar a célula hospedeira à apoptose, com isso restringindo o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* (Herbst *et al.*, 2011).

A autofagia pode auxiliar na expressão de iNOS, conforme foi visto em macrófagos infectados com *Pseudomonas aeruginosas* (Li *et al.*, 2015). A autofagia induzida pela infecção de *P. aeruginosas* ativa a via JAK2/ STAT1 α ,

aumentando a produção de NO (Li *et al.*, 2015). Na infecção por *S. typhimurium*, iNOS expressa por macrófagos foi necessária para indução da transcrição de ferroportina-1 (Fpn1) por Nfr2 um exportador de ferro, expresso na membrana celular e na membrana fagossomal. Com isso, a privação de ferro mostrou controle mediado por iNOS em macrófagos *in vitro* e *in vivo* inibindo crescimento desse parasito intracelular (Nairz *et al.*, 2013).

Outras atividades antimicrobianas indiretas de NO incluem a estimulação da maturação e fusão fagolisossomal (Axelrod *et al.*, 2008), a inibição da expressão de sistemas de secreção bacteriana, moléculas efetoras, toxinas, adesinas (Vareille *et al.*, 2007; Branchu *et al.*, 2014) ou contribuem para a dispersão de biofilmes bacterianos (Barraud *et al.*, 2014) e vários efeitos imunomoduladores que ajudam a proteger contra patógenos infecciosos (Bogdan, 2011).

Microrganismos desenvolveram mecanismos para resistir ao estresse causado pelo NO, dentre muitos organismos, podemos citar alguns como *Salmonella* (Lu *et al.*, 2012), *Escherichia coli* (Fang, 2004), *M. tuberculosis* (Davis *et al.*, 2007), *Neisseria meningitidis* (Bogdan 2011); e também *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016).

1.4.3. Mecanismos de inibição de iNOS de macrófago por *Toxoplasma gondii*

Sabemos que a mais de cem anos, *T. gondii* foi descoberto e vem sendo estudado (Nicolle e Manceaux, 1908). Mais de cem anos se passaram e ainda não temos a elucidação de como o parasito pode ser totalmente erradicado do hospedeiro (Subauste, 2009). O sucesso da sobrevivência desse protozoário está diretamente relacionado ao processo adaptativo que esse parasito desenvolveu como inúmeros mecanismos de evasão do sistema imunológico.

Já foi demonstrado que o NO é capaz de provocar morte de *T. gondii* em macrófagos infectados (Adams *et al.*, 1990). No entanto o parasito desenvolveu uma forma de evadir desse sistema microbicida, inibindo a produção desse gás (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016) devido a degradação de sua enzima precursora, a iNOS (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014). A inibição

da enzima iNOS ocorre porque *T. gondii* expõe fosfatidilserina, induzindo a produção de TGF- β_1 que possui efeito autócrino em macrófagos causando a degradação da iNOS (Seabra *et al.*, 2004; Damasceno-Sá, 2013). Essa enzima é naturalmente regulada por três possíveis vias de degradação, a via do proteossomo, da calpaina e a via lisossomal (Kone *et al.*, 2003; Musial e Eissa, 2001). No entanto, experimentos do grupo indicam que a via do proteossomo é a principal envolvida na degradação da enzima iNOS após a infecção de *T. gondii* em macrófagos J774-A1 ativados com IFN- γ (Padrão *et al.*, 2014).

1.4.4. A produção de óxido nítrico pelas células epiteliais intestinais

As IEC possuem importante papel imunológico como barreira física e como fonte de inúmeras citocinas e quimiocinas que são cruciais na resposta imune local, pois atraem inúmeros tipos celulares. As IEC também são produtoras de NO (Buzzoni-Gatel e Werts, 2006). Já foi descrito que a produção de NO é realizada por uma infinidade de células incluindo as IEC (Bogdan, 2001) sendo responsável pela capacidade microbicida dessas células (Bogdan 2000; 2001; 2011; Nathan 2000; Feng e Walker, 2000; Jyoti *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015). A ação do NO pode variar de acordo com o tipo de célula epitelial e tipo de microrganismo que está sofrendo a ação desse agente microbicida. O NO em IEC do cólon humanas aparece como sendo importante para o processo patofisiológico em doença inflamatória intestinal, doenças epiteliais intestinais onde as citocinas IL-4 e IL-13 regulam sua produção (Kolios *et al.*, 1998).

NO secretado pelas IEC não aparece como sendo mecanismo inibitório de parasitos como *T. gondii* (Yap e Sher, 1999). No entanto, camundongos *knockouts* para CCR2 infectados oralmente com *T. gondii* apresentam extensa necrose no intestino delgado, pois os monócitos inflamatórios necessitam desse receptor para migrarem ao local de multiplicação do parasito (Dunay *et al.*, 2008). Com a não migração desse monócitos, as células da lamina própria ficam iNOS negativas, mostrando que a infecção induz a migração dessas células que chegam e produzem NO controlando o parasito (Dunay *et al.*, 2008). As IEC dos animais *knockout* apresentam grande expressão de iNOS que supostamente ajudam essas células no controle da proliferação do parasito, já que são as

últimas a serem destruídas nos tecidos inflamados (Dubey *et al.*, 2012; Dunay *et al.*, 2008).

1.5. Autofagia

1.5.1. Mecanismos autofágicos desenvolvidos naturalmente pelas células

Autofagia é um processo celular dinâmico dependente de energia gerado de estresse que a célula sofre objetivando a auto-preservação (Fischer *et al.*, 2014). Autofagia também é um termo geral das vias pelas quais o material citoplasmático é entregue aos lisossomos para degradação (Mizushima *et al.*, 2010). O processo autofágico é essencial para identificação de excedentes desnecessários como proteínas e organelas disfuncionais, providenciando a digestão desses componentes, para manutenção da função celular e reciclagem de componentes citoplasmáticos reutilizáveis (Fischer *et al.*, 2014).

Sabe-se que defeitos autofágicos geram doenças neurodegenerativas, câncer, envelhecimento, isquemias, doenças causadas por acúmulo de proteínas, organelas anormais ou disfuncionais (Yang e Klionsky, 2010; Klionsky, 2012).

Existem pelo menos três diferentes tipos de autofagia: a) macroautofagia, b) microautofagia e c) autofagia mediada pelas chaperonas (Levine *et al.*, 2011). A macroautofagia refere-se ao processo direto de autofagia, onde há formação de duplas membranas no citoplasma, o fagóforo, e uma porção citoplasmática é engolfada formando o que é conhecido como autofagossomo (Levine *et al.*, 2011). Os autofagossomos irão se fundir aos lisossomos, formando os autofagolisossomos onde, por ação enzimática dos lisossomos, haverá a degradação do material engolfado pela dupla membrana (Figura 3) (Levine *et al.*, 2011). Estudos demonstram que o retículo endoplasmático é crucial para a formação do autofagossomo, resultando na dupla membrana, mostrando que há o envolvimento de proteínas de extrema importância dessa organela no processo autofágico (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009).

A microautofagia envolve a degradação de componentes citoplasmáticos como proteínas e organelas utilizando a própria membrana do lisossomo como membrana de iniciação (Zappavigna *et al.*, 2013). O mecanismo foi originalmente descrito em leveduras e, em menor proporção, nas células eucarióticas (Li *et al.*, 2012).

No processo de autofagia mediada por chaperonas, as proteínas são direcionadas para a degradação no lisossomo através da ação de tais moléculas. As proteínas que sofrerão a degradação lisossomal apresentam a sequência sinal KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Dice, 1990). A sequência de aminoácidos é reconhecida pela chaperona citosólica Hsc70 (proteína de *choque* térmico cognata 70) que, juntamente com co-chaperonas, direcionam a proteína substrato à superfície dos lisossomos (Chiang *et al.*, 1989) onde se liga ao receptor LAMP-2A (proteína membranar do tipo 2A associada ao lisossomo), isoforma de LAMP-2. A translocação do substrato através da membrana lisossomal também requer a presença de uma forma luminal de Hsc70 (lys-Hsc70), que auxilia na translocação para o lúmen lisossomal (Agarraberes *et al.*, 1997; Cuervo *et al.*, 1997). Uma multimerização da Lamp-2A ocorre, gerando um poro por onde o substrato será translocado para sua degradação. Após a translocação, as proteínas substrato são rapidamente degradadas na matriz abundante em hidrolases lisossomais.

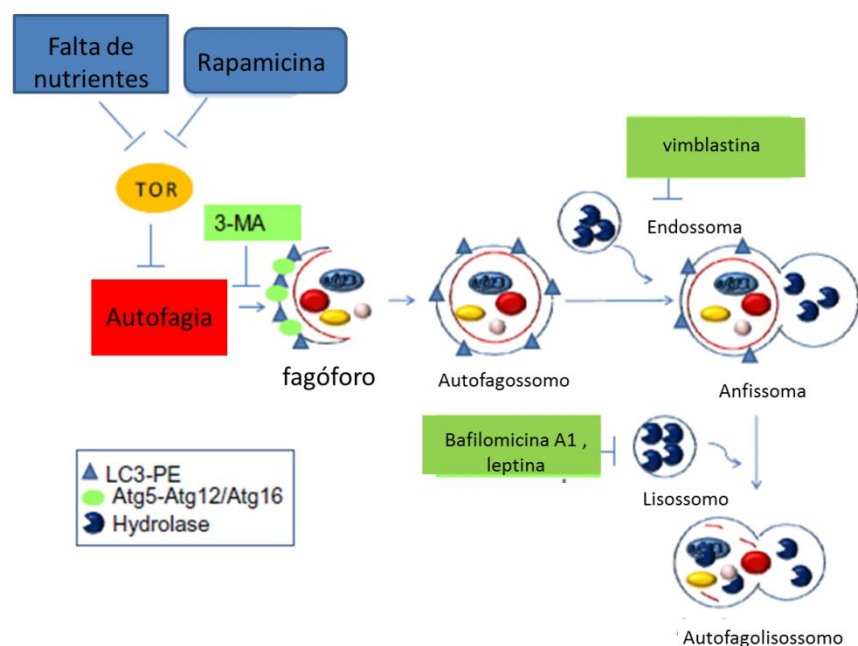


Figura 3: Esquema da formação do autofagolisossomo. A figura representa o processo de formação do autofagossomo. A célula é estimulada para indução autofágica, pela deprivação nutricional ou por rapamicina. Nesse momento há inibição da via TOR, induzindo mecanismos autofágicos que se inicia com a formação do fagóforo, dando origem ao autofagossomo. O autofagossomo se une com endossoma formando o anfissoma e a junção do anfissoma com o lisossomo, dará origem ao autofagolisossomo. Traduzido de Zappavigna *et al.* (2013).

Em estado normal de desenvolvimento celular do organismo, a insulina sinaliza para a célula que os níveis de nutrientes estão em quantidade adequada

e a via TOR (do Inglês *Target of Rapamycin*) bloqueia mecanismos autofágicos (Suzuki e Oshumi, 2007). Com isso a célula consegue crescer e se desenvolver. Por outro lado, quando a via de TOR é bloqueada, quem se torna ativa é a via de Classe III fosfatidilinositol 3 quinase que recruta diversas proteínas que serão importantes no processo autofágico (Suzuki e Oshumi, 2007).

Embora a autofagia tenha sido identificada em células de mamíferos a mais de 50 anos, a compreensão molecular iniciou-se a partir da década passada, grande parte com base na descoberta dos genes relacionados a autofagia (ATGs) que foram inicialmente identificados em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki e Oshumi, 2007) e seus homólogos seguidamente identificados em eucariotos superiores (Yang e Klionski, 2010).

De acordo com estudos feitos em leveduras, os ATGs foram divididos em seis grupos: (1) Complexo ATG1/ULK1 quinase, (2) ATG9, (3) Complexo classe III fosfatidilinositol 3 quinase (que compreende as proteínas ATG6, ATG14 Vps15 e ATG14 Vps 34, (4) PI(3) P que se liga ao complexo ATG2-ATG18, (5) Sistema de conjugação ATG12 com as proteínas ATG12, ATG5 e ATG16, (6) Sistema de conjugação ATG8 com a proteína ATG8 e a fosfatidiletanolamina (PE-*phatidylethanolamine*) (Yang *et al.*, 2013).

Em *S. cerevisiae* ATG1 associa-se à numerosas outras proteínas da família ATG para formar o autofagossomo. Tem sido demonstrado que ATG1 não possui importância apenas para fosforilar algumas proteínas, mas também é crucial no recrutamento de outras proteínas no processo autofágico (Ganley *et al.*, 2009).

ATG9 auxilia na etapa de expansão para formação da dupla membrana que irá ativar o complexo classe III fosfatidilinositol 3 quinase; com a ativação desse complexo, ocorre uma série de eventos que auxiliam na formação do autofagossomo (Yang *et al.*, 2013). Para que ocorra a formação do fagóforo, dois sistemas de conjugação são requeridos o sistema ATG12 e ATG8.

No momento em que ocorre a ligação de ATG12 à uma lisina de ATG5, forma-se o complexo ATG12-ATG5-ATG16. Esse complexo é conhecido por atuar na expansão vacuolar em formação controlando a curvatura durante a formação da dupla membrana (Tanida *et al.*, 2002). O outro sistema de conjugação é o da proteína ATG8, que é homólogo da proteína LC3 (MP1LC3 – *Microtubule-associated protein light chain 3*) de mamíferos. Essa proteína está envolvida diretamente no processo de formação do autofagossomo (Yorimitsu e Klionsky.,

2005). A proteína LC3 tem sido amplamente utilizada como marcador específico para vacúolos autofágicos (Mizushima e Yoshimori, 2007; Weidberg *et al.*, 2010).

Uma vez que houver a formação do autofagossomo, esse irá se fundir ao lisossomo, formando o autofagolisossomo e posterior degradação dos conteúdos citoplasmáticos (Levine, 2011).

1.5.2. Autofagia como mecanismo microbicida

Os microrganismos causam desordem nos sistemas em que se instalam (Fischer *et al.*, 2014). Apesar disso, há eliminação de microrganismos como vírus, bactérias e protozoários por mecanismos microbicidas incluindo a via autofágica (Deretic e Levine, 2009; Virgin e Levine, 2009). A função primordial da maquinaria autofágica é necessária para resposta contra o estresse, permitindo que organismos eucariotos sobrevivam em condições adversas. No entanto, a mesma maquinaria poderá por sua vez, se diversificar em organismos metazoários, regulando novas formas de defesa para confrontar diferentes formas de estresse incluindo infecção (Levine *et al.*, 2011). O conhecimento dos processos autofágicos se mostra essencial para entender como alguns microrganismos são eliminados por essa via (Fischer *et al.*, 2014).

A importância da autofagia como um mecanismo microbicida é evidente, pois a mutação de genes autofágicos aumenta a suscetibilidade à infecção por agentes patogênicos intracelulares em muitos tipos de organismos (Levine *et al.*, 2011). Esse fenômeno ocorre em plantas, vermes, roedores e seres humanos, demonstrando alto grau de conservação desse mecanismo (Levine *et al.*, 2011).

Atualmente uma infinidade de estudos, que variam desde a biologia celular, biologia de sistemas, bioquímica e estudos genômicos, tem convergido para apoiar a ideia de que a resposta autofágica que ocorre em função de um estresse inclui mecanismos envolvidos no controle da resposta imune e inflamação (Kroemer *et al.*, 2010). Essa interação não ocorre apenas a nível autofágico, mas também através de mecanismos de sinalização de moléculas do sistema imune (Saitoh, 2010).

Podemos dizer que existe um envolvimento direto entre mecanismos autofágicos e proteínas envolvidas na inflamação, pois sabemos que as proteínas da autofagia funcionam tanto na indução como na supressão de respostas inflamatórias que ocorrem em função tanto de indução e supressão autofágica.

Além disso, também existe associação da autofagia com outros tipos de patologias, patogênese microbianas e síndromes inflamatórias (Joven *et al.*, 2014).

A forma com que os microrganismos são eliminados por autofagia é diferente da forma de eliminação convencional de proteínas ou organelas danificadas (Kraft *et al.*, 2010). O nome dado a esse tipo de eliminação é xenofagia (Bauckman *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm mostrado que há diferenças e semelhanças entre o reconhecimento celular e degradação contra componentes microbianos através das vias autofágicas. Quando as células são infectadas, a autofagia é ativada através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos por receptores Toll. Isso permite que os patógenos sejam eliminados por mecanismos autofágicos tanto pela imunidade inata quanto pela imunidade adaptativa (Vural *et al.*, 2015).

O direcionamento de agentes patogênicos por autofagia é seletivo e implica em uma crescente família de receptores envolvidos nos processos autofágicos como a proteína LC3 e ATG8. Esses organismos são ubiquitinados e com isso passam a ser reconhecidos como substratos para autofagia e são entregues aos autofagossomos. (Vural *et al.*, 2015).

Há evidências de que alguns patógenos fujam da destruição completa por autofagia. Para algumas bactérias, tem sido demonstrado que esse mecanismo envolve proteínas que evitam o reconhecimento pelos receptores autofágicos da superfície desses microrganismos. Vírus, como por exemplo o norovírus e outras bactérias são resistentes à degradação em lisossomas e usam autofagossomas e lisossomas como sítios para replicação (Hwang *et al.*, 2012).

Sabe-se que protozoários patogênicos como *T. gondii* também podem ser eliminados pela via autofágica (Choi *et al.*, 2014). Com a invasão ativa de *T. gondii* ocorre a formação do VP não fusogênico (Sibley, 2011). Dentro desse VP o parasito se replica enquanto se protege do sistema imune do indivíduo infectado. As células infectadas por sua vez, respondem ao parasito quando ativadas por IFN- γ através de moléculas efetoras como as GTPases relacionadas a imunidade (IRGs) e proteína ligadora de guanilato (GBPs) (Howard *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). Essas proteínas se acumulam ao redor da membrana do VP destruindo o parasito. Além desses mecanismos, também foi demonstrado que é necessário a

presença de ATG5 para o direcionamento adequado dessas proteínas efetoras para a membrana do VP controlando o crescimento de *T. gondii* (Figura 4) (Zhao *et al.*, 2008; 2009; Selleck *et al.*, 2013;). Quando não existe a presença de ATG5, essas proteínas efetoras (GTPases relacionadas a imunidade e proteína ligadora de guanilato) formam agregados citoplasmáticos, ao invés de se acumularem na membrana do VP (Howard *et al.*, 2011). Portanto, existe envolvimento de autofagia ou pelo menos de componentes desse mecanismo no controle do crescimento intracelular de *T. gondii*.

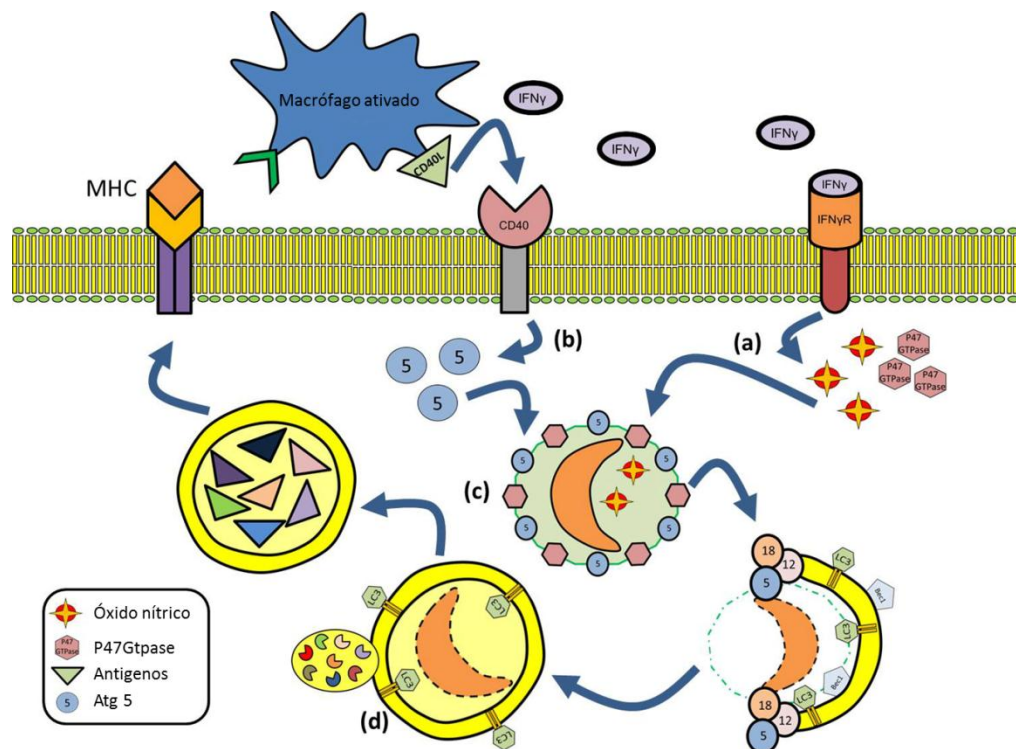


Figura 4: O papel da autofagia em *Toxoplasma gondii* na interação com células fagocíticas profissionais. (a) IFN- γ recrutando P47GTPases ao redor do vacúolo parasitário, induzindo a produção de óxido nítrico que limita a replicação parasitária. (b) CD40L ativa Atg 5 que por sua vez recruta a maquinaria autofágica para a membrana do vacúolo parasitário. (c) degradação da membrana do vacúolo parasitário por P47GTPase e Atg 5. (d) Eliminação do *T. gondii* por fusão autofagolisossomal com uma possível contribuição do processo de apresentação de antígenos MHC II. Traduzido de Duque *et al.* (2013).

Essas observações foram essenciais para entendermos que as proteínas autofágicas desempenham um papel amplo na biologia independente da degradação de organelas citoplasmáticas e outros constituintes (Bestebroer *et al.*, 2013; Subramani e Malhotra, 2013).

1.5.3. Autofagia em células epiteliais intestinais

Sabemos que as células de organismos metazoários fazem autofagia, seja qual for o motivo, pois esse mecanismo está associado a inúmeros processos celulares. As IEC desempenham importante papel de defesa no nosso organismo em razão de estarem sendo desafiadas constantemente por uma série de diferentes microrganismos. Portanto, essas células podem fazer uso da autofagia como mecanismo microbicida.

A autofagia vem sendo relatada como importante mecanismo de defesa em células epiteliais por reconhecer e degradar agentes patogênicos intracelulares (Deretic e Levine, 2009). Autofagia em IEC tem sido demonstrada por ter a capacidade de atuar na imunidade inata limitando a disseminação de bactérias invasoras que passam pelo epitélio intestinal (Benjamin *et al.*, 2013). Além disso, também foi demonstrado que quando a autofagia é interrompida em ratos os torna suscetíveis a uma forma de colite. Notavelmente essa suscetibilidade é dependente da exposição a um tipo comum de vírus entérico, que proporciona interação genético-ambiental, que contribuí para o desenvolvimento dessa colite (Cadwell *et al.*, 2010).

As IEC protegem os tecidos intestinais da invasão de bactérias comensais invasivas, e patógenos intestinais invasivos como *S. typhimurium*. Foi demonstrado que esse processo de proteção é desempenhado pela ação de autofagia dessas células. Esse processo requer a sinalização de MyD88 do sistema imune inato (Benjamin *et al.*, 2013).

2. Justificativa

A via natural de infecção por *T. gondii* é a via oral. Após a ingestão, esse parasito passa pelo trato gastrointestinal e as primeiras células infectadas são as IEC. Os parasitos atravessam essas células, infectam e se multiplicam nas células da lâmina própria, provocando extenso processo inflamatório, e se disseminam via corrente sanguínea ou linfática para tecidos distantes. Curiosamente, as IEC são as últimas células que são destruídas durante o processo inflamatório intestinal. Em razão das IEC fazerem o primeiro contato com *T. gondii* e serem relativamente resistentes a esse parasito é importante conhecer se mecanismos como a produção de NO e a autofagia são utilizados por essas células a fim de minimizar ou impedir a proliferação desse parasito e entender como o parasito escapa desses mecanismos.

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Caracterizar se a produção de NO e a autofagia estão envolvidos no sistema microbicida das IEC ativadas e se o *Toxoplasma gondii* é capaz de inibir a expressão da iNOS após a infecção nas IEC-6.

3.2. Objetivos Específicos

- Confirmar se a ativação das IEC-6 com IFN- γ e LPS induz a expressão de iNOS e produção de NO;
- Verificar o crescimento de *T. gondii* nas IEC-6 ativadas e não ativadas;
- Analisar se ocorre inibição da expressão de iNOS e da produção de NO em IEC-6 ativadas após infecção pelo parasito;
- Analisar se a produção de NO é responsável pelo controle do crescimento de *T. gondii* em IEC-6 utilizando Nitro-L-Arginina (inibidor de iNOS);
- Verificar se a autofagia está envolvida no processo de controle de *T. gondii* pelas IEC-6 avaliando expressão de vesículas autofágicas e associação com os parasitos dentro de IEC-6 ativadas;
- Confirmar se há expressão de iNOS em IEC do íleo de camundongos CCR2^{-/-} infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e se essas células de explantes desse órgão apresentam redução da expressão dessa enzima quando infectados com *T. gondii in vitro*.

4. Materiais e métodos

4.1. Manutenção da IEC-6

A linhagem celular de epitélio intestinal de rato (IEC-6) (Quaroni *et al.*, 1979) foi mantida em garrafas de 25 cm² na presença do meio *Dubelcco's modified Eagle medium* (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1U/ml de insulina recombinante humana (Humulin). Mantidas a 37° C em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Atingindo confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando 1 ml de tripsina por poucos segundos e adição de 4 ml de DMEM com SFB. As células liberadas foram centrifugadas a 500g, 10 min, 4° C, ressuspendidas em 1ml de DMEM com SFB, contadas na câmara de Neubauer e plaqueado 5 x 10⁵ células sobre lamínula redonda na placa de 24 poços com 200 µl de DMEM. As células foram ativadas logo após plaqueamento com IFN- γ .

4.2. Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH (Sabin e Feldman, 1948), foram mantidos por passagens sucessivas na cavidade intraperitoneal de camundongos suíços com idade entre três e quatro semanas. Após o período de 48 h o lavado peritoneal foi realizado com DMEM (Trembicki *et al.*, 1984), para obtenção dos parasitos. Para obtenção de taquizoítos de ME-49 foram mantidos por sucessivas passagens em células vero. Células vero com altas taxas de infecção foram lavadas para a eliminação de parasitos livres, raspadas e rompidas através da passagem em seringa e agulha de 26G, para liberação de taquizoítos. A suspensão celular foi centrifugada a 500 x g e o sobrenadante foi passado em filtro de 3 µm. Este estudo foi realizado em estrita conformidade com a lei de experimentação animal 11.794/08. O protocolo de estudo usando camundongos foi analisado e aprovado pelo comitê de ética no uso animal da UENF, protocolo 254.

4.3. Obtenção de cistos teciduais de *Toxoplasma gondii*

A cepa ME-49 foi mantida em camundongo em um banco de parasitos localizado no infectório do LBCT. A manutenção do banco foi realizada da seguinte maneira: camundongos suíços foram inoculados via peritoneal com 20 cistos de ME-49, em 0,2 ml de PBS. Quando estes camundongos atingiram o

estágio crônico da doença (3 meses após a inoculação) foram eutanasiados com CO₂, os cérebros removidos e homogenizados em 1 ml de tampão fosfato (PBS). Em seguida, foi realizada a contagem dos cistos, em alíquotas de 20µl entre lamina e lamínula. A utilização de parasitos provenientes deste banco em experimentos anteriores demonstra uma padronização dos cistos utilizados, tanto em tamanho quanto em quantidade. Esta metodologia foi adaptada de Liesenfeld *et al.* (1996).

4.4. Ativação da IEC-6 com lipopolissacarídeo e diferentes concentrações de Interferon gamma.

Para determinar qual concentração as IEC-6 poderiam produzir NO, as células foram ativadas com LPS (0,2 µg/ml) e IFN-γ (200, 400, 800U/ml). Em seguida essas células foram ativadas apenas com IFN-γ, com concentrações que variavam de 50 à 1.600 U/ml.

4.5. Interação *Toxoplasma gondii* com IEC-6

Conforme relatado no item 4.4, as células ativadas com IFN-γ foram cultivadas por 24 h em estufa de CO₂ a 37° C e os taquizoítos de *T. gondii*, obtidos conforme o item 4.2, foram acrescidos as células em uma concentração de 5X10⁶ células e cultivadas em estufas de 37° C por 2, 24 e 48 h para verificar se o IFN-γ seria capaz de inibir crescimento do *T. gondii*, após 2 h de infecção as células foram lavadas e foi adicionado novo meio contendo IFN-γ, em alguns experimentos foi adicionado as células nitro-L-arginina (inibidor de iNOS) nas concentrações de 10, 5 e 1 mM. As células também foram infectadas por 3, 6, 12 e 24 h para analisar o envolvimento da autofagia na inibição da proliferação do parasito. Após o período de infecção as lamínulas foram coletadas, fixadas e coradas com Giemsa, para quantificação do número de parasitos aderidos ou internalizados. As células também foram fixadas e processadas para imunolocalização de vesículas autofágicas, parasitos e núcleo. Os sobrenadantes das culturas foram coletado para dosagem de NO.

4.6. Avaliação de nitrito

NO foi indiretamente avaliado medindo-se o nitrito nos sobrenadantes das culturas coletados após 24 e 48 h de ativação (Green *et al.*, 1982). Brevemente,

50µl do sobrenadante de cada poço foi colocado com um mesmo volume do reagente de Griess (1:1, de 0,1% N-1-nafti-etilanadamina, Sigma – N-5889, em água destilada e 1% de sulfanilamida, Sigma – S-9251 em 5% de ácido fosfórico, Sigma – P5811) em placas de 96 poços. Após 10 min, a concentração de nitrito foi avaliada através da leitura da absorbância em 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão pré-calibrada usando nitrito de sódio diluído em DMEM. Para verificar qual concentração possuía a maior produção de NO foi feito teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.7. Avaliação do crescimento de *Toxoplasma gondii* em IEC-6

Após interação de IEC-6 com *T. gondii* (RH) em diferentes tempos (2, 24 e 48 h e 24 h na presença do inibidor de iNOS Nitro-L-arginina), as lamínulas foram recolhidas, fixadas em metanol, e coradas com solução de Giemsa (diluído em água destilada na proporção de 1:10), desidratadas numa série de soluções acetona-xilol, montadas sobre Entellan e observadas em microscópio óptico Axioplan - ZEISS. O crescimento do parasito foi avaliado contando nas células coradas o seguinte: a) células infectadas, b) células não infectadas, c) parasitos. Com essas contagens calculou-se: 1- porcentagem de IEC-6 infectadas, 2- número médio de parasitos interiorizados nas IEC-6, 3- índice de infecção que é a porcentagem de IEC-6 infectadas multiplicado pelo número médio de parasitos interiorizados nas IEC-6. Esses valores foram utilizados para analisar o desenvolvimento de *T. gondii* nas IEC-6 ativadas com IFN- γ e não ativadas e com o inibidor de iNOS. Foram realizados Testes t de *Student* para observar a significância dos resultados utilizando $P < 0,05$

4.8. Imunolocalização de iNOS, vesículas autofágicas e *Toxoplasma gondii* em IEC-6

As lamínulas contendo células aderidas foram fixadas por 30 min em 3% de formaldeído recém preparado em PBS, lavadas e incubadas por 10 min com Triton X-100, lavadas 3 vezes com PBS, incubadas por 20min em 50mM de cloreto de amônio em PBS e 10 min em 3% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, A3912) em PBS (BSA-PBS). Para a marcação de iNOS e *T. gondii* as células foram incubadas por 40 min com anticorpo primário anti-iNOS NOS2 policlonal igG produzido em coelho diluído 1:200 e anti-*T. gondii* (soro de

camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*) diluído 1:5000 em PBS-BSA. Para a imunolocalização de vesículas autofágicas as células foram incubadas por 40 min com anticorpo primário anti-LC3A para marcação de vesículas autofágicas diluído 1:300 em PBS-BSA e anticorpo primário anti-*T. gondii* diluído 1:5000 em PBS-BSA. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com PBS-BSA; incubadas por 30min com IgG de coelho marcado com Alexa 488 (molecular probes) que revelou iNOS e LC3A diluído 1:100 em PBS-BSA e anti-mouse IgG conjugado com TRITC (Sigma) diluído 1:400 em PBS-BSA, para revelar taquizoitos. Após o período de incubação, as células foram lavadas por 8 vezes com PBS, montadas em Prolonggold com DAPI e sem DAPI (Molecular Probes) e as imagens capturadas com câmera AxioCam Mrc5 no sistema Axiovision da Zeiss.

4.9. Curva de sobrevivência de animais CCR2^{-/-}

Dois grupos contendo 8 animais cada, foram infectados oralmente com 5 e 10 cistos de *T. gondii* cepa ME-49 obtidos conforme o item 4.3. Esses animais foram monitorados por um período de 30 dias, e a sobrevivência foi analisada.

4.10. Cultura de explantes de íleo de animais CCR2^{-/-}

Os animais CCR2^{-/-} foram infectados por via oral com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME-49. Após o período de 3, 6, 7 e 9 dias esses animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, seu íleo foi removido e cortado em quatro partes. Esses cortes foram então lavados com PBS contendo o antibiótico gentamicina e cultivados por 1 e 3 h, onde a metade dos cortes foram infectadas com 10⁸ parasitos/corte. Após os respectivos tempos de cultivo, os cortes foram novamente lavados com PBS e foram imersos em fluido de congelamento, embebidas em OCT (TissueTek), congeladas e armazenadas à -70°C. Frações congeladas do íleo foram cortadas em criostato. Os cortes congelados foram incubados com anticorpo primário anti-*T. gondii* (1:400), anti-iNOS (1:500), e anticorpos secundários IgG de coelho marcado com Alexa 488 (Molecular Probes) diluído 1:2000 em PBS-DIL e anti-mouse IgG conjugado com TRITC (sigma) diluído 1:2000 em PBS-DIL.

5. Resultados

5.1. IEC-6 ativadas com IFN- γ produziram quantidades significativas de óxido nítrico e expressaram a enzima óxido nítrico sintase induzida

A fim de avaliar o papel de LPS e IFN- γ na produção de NO em IEC-6, testamos duas variáveis: IFN- γ associado a LPS e IFN- γ puro. As IEC-6 ativadas apenas com IFN- γ produziram quantidades de NO dose dependente maiores que o nitrito produzido pelas células ativadas com LPS e IFN- γ . (Figura 5). Esses resultados foram confirmados por imunofluorescência no qual a maior quantidade de expressão de iNOS pelas IEC-6 foi verificada em células ativadas somente com IFN- γ (Figura 6).

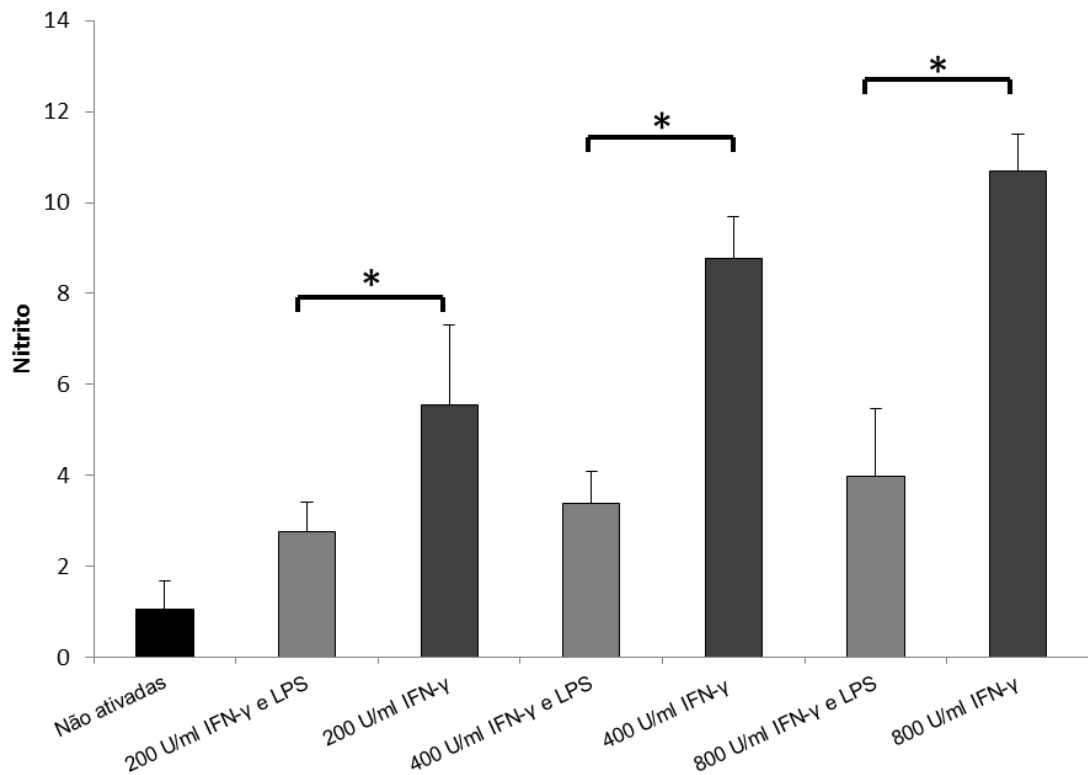


Figura 5: Efeito da ativação com interferon-gamma (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) em IEC-6 por 24 h na produção de nitrito (μ M). IEC-6 ativadas apenas com IFN- γ produzem maiores quantidades de NO. Resultados expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. Concentração de LPS foi de 0,2 μ g/ml. *Significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

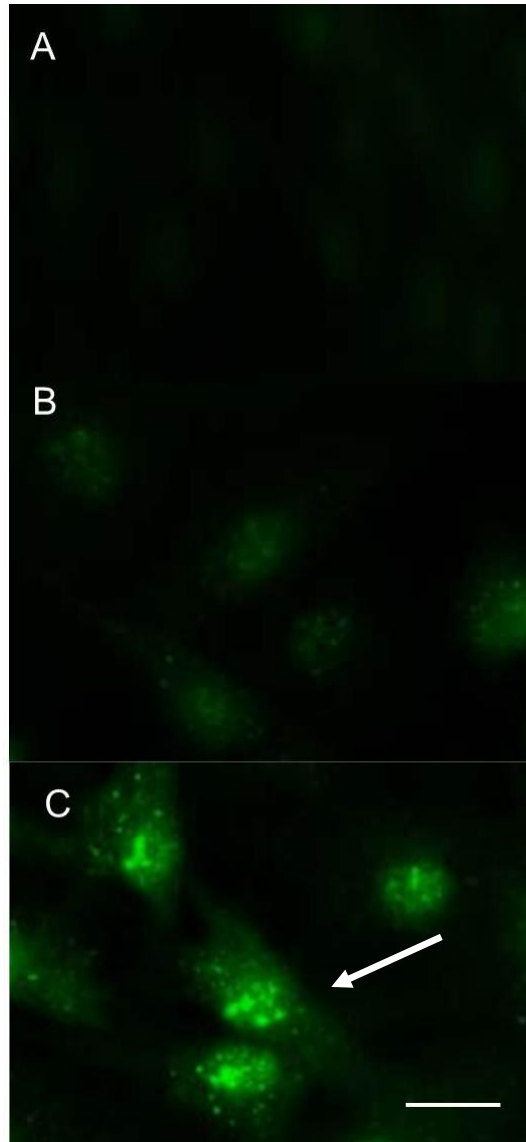


Figura 6: Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas ou não após 24 h de cultivo imunomarcadas com anti-iNOS (verde). (A) IEC-6 não ativadas. (B) IEC-6 ativadas com interferon-gamma (IFN- γ) e lipopolissacarídeo. (C) IEC-6 ativadas somente com IFN- γ . IEC-6 ativadas com IFN- γ expressaram mais iNOS (seta). Barra: 40 μ m.

Em razão das IEC-6 apresentarem maior expressão de iNOS quando ativadas somente com IFN- γ , diferentes concentrações dessa citocina, variando de 50 à 1.600 U/ml, foram testadas para produção de NO analisada. A medida que aumentou-se a concentração de IFN- γ observou-se um aumento na produção de NO pelas IEC-6 (Figura 7). Os últimos três tratamentos (800, 1250 e 1600 U/ml) foram equivalentes. Com isso, optamos por utilizar em todos os experimentos a concentração de 800 U/ml de IFN- γ , pois foi a menor concentração que apresentou o resultado de produção ótima (Figura 7).

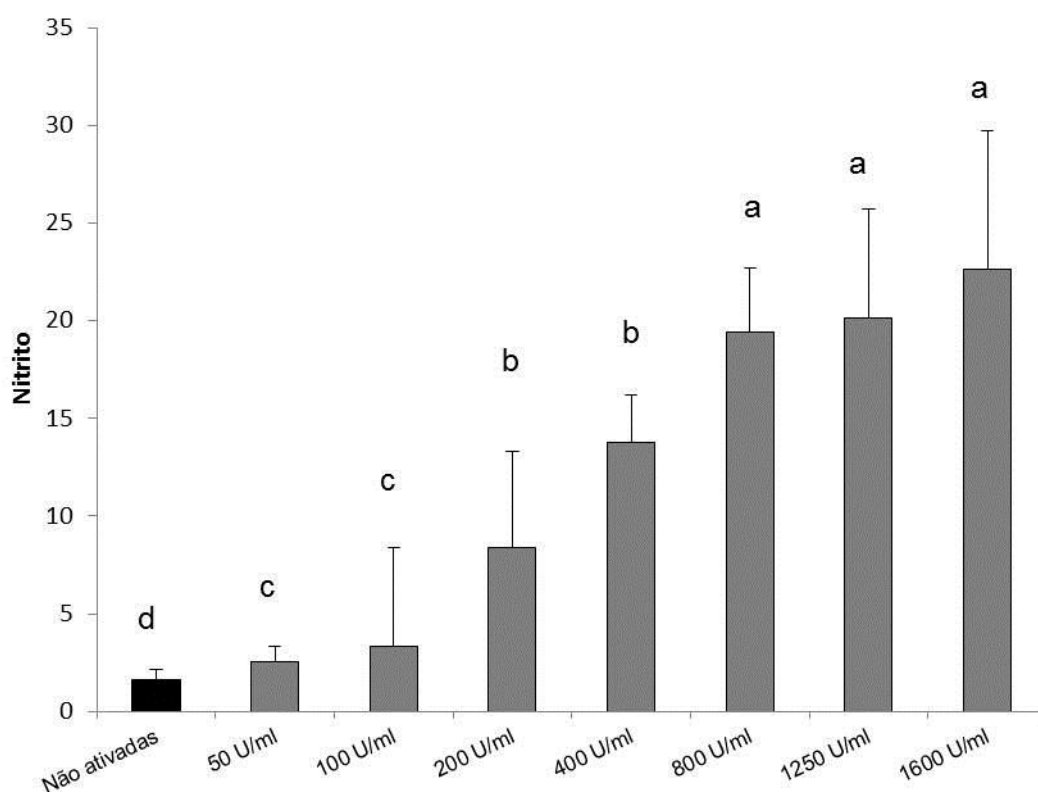


Figura 7: Maiores concentrações de Interferon-gama induziram maior produção de nitrito (μM) em células epiteliais intestinais após 24 h de ativação. Os tratamentos de maior produção foram com as concentrações de 800, 1250 e 1600 U/ml. Resultados expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2. Infecção por *Toxoplasma gondii* Inibiu a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida e produção de óxido nítrico em IEC-6.

A infecção com ambas as cepas (RH e ME-49) inibiram a produção de NO pelas IEC-6 ativadas após 24 h de infecção (Figura 8). No entanto, a produção de NO pelas IEC-6 infectadas com a cepa ME-49 não foi diferente das células não infectadas após 48 h de infecção (Figura 8).

A imunolocalização da iNOS demonstrou que ambas as cepas inibiram a expressão de iNOS após 24 h de infecção (Figura 9A com 9B e 9D com 9E). A baixa expressão de iNOS foi mantida após infecção com a cepa RH por 48 h (Figura 9A com 9B e 9C). Porém, IEC-6 infectadas com a cepa ME-49 recuperaram a expressão de iNOS após 48 h de infecção (Figura 9D com 9E e 9F).

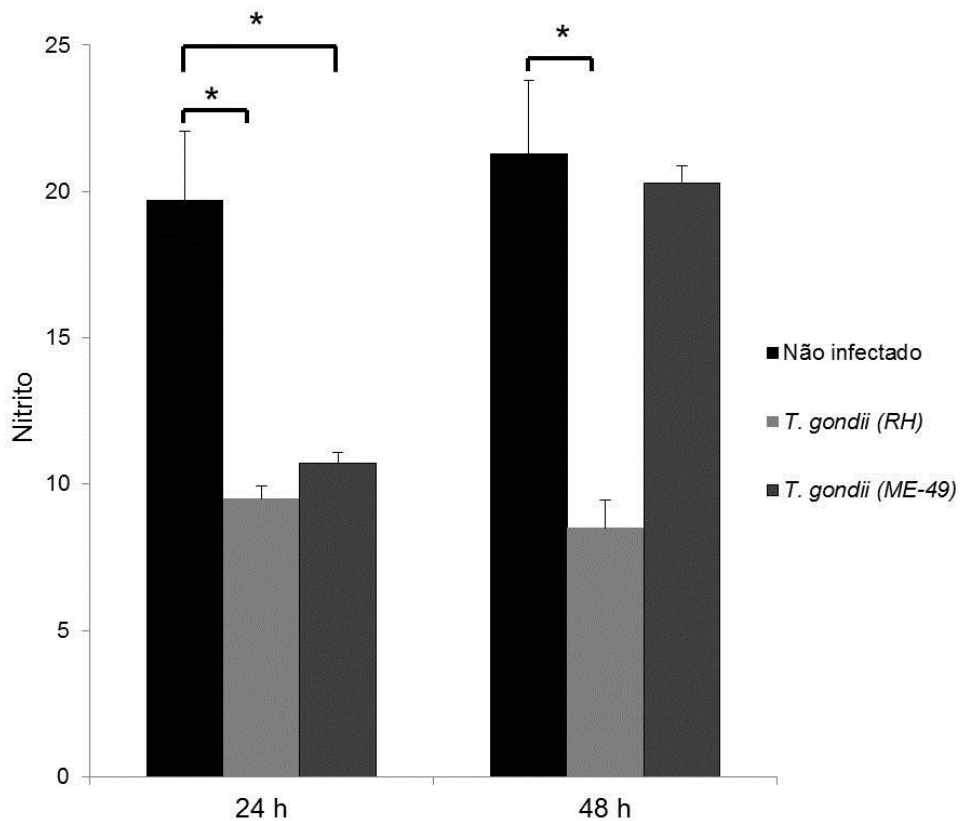


Figura 8: Células epiteliais intestinais ativadas com interferon-gama infectadas por *Toxoplasma gondii* produziram menos nitrito (μM) com ambas as cepas após 24 h, mas apenas a cepa RH manteve a inibição após 48 h. Resultados expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. *Significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

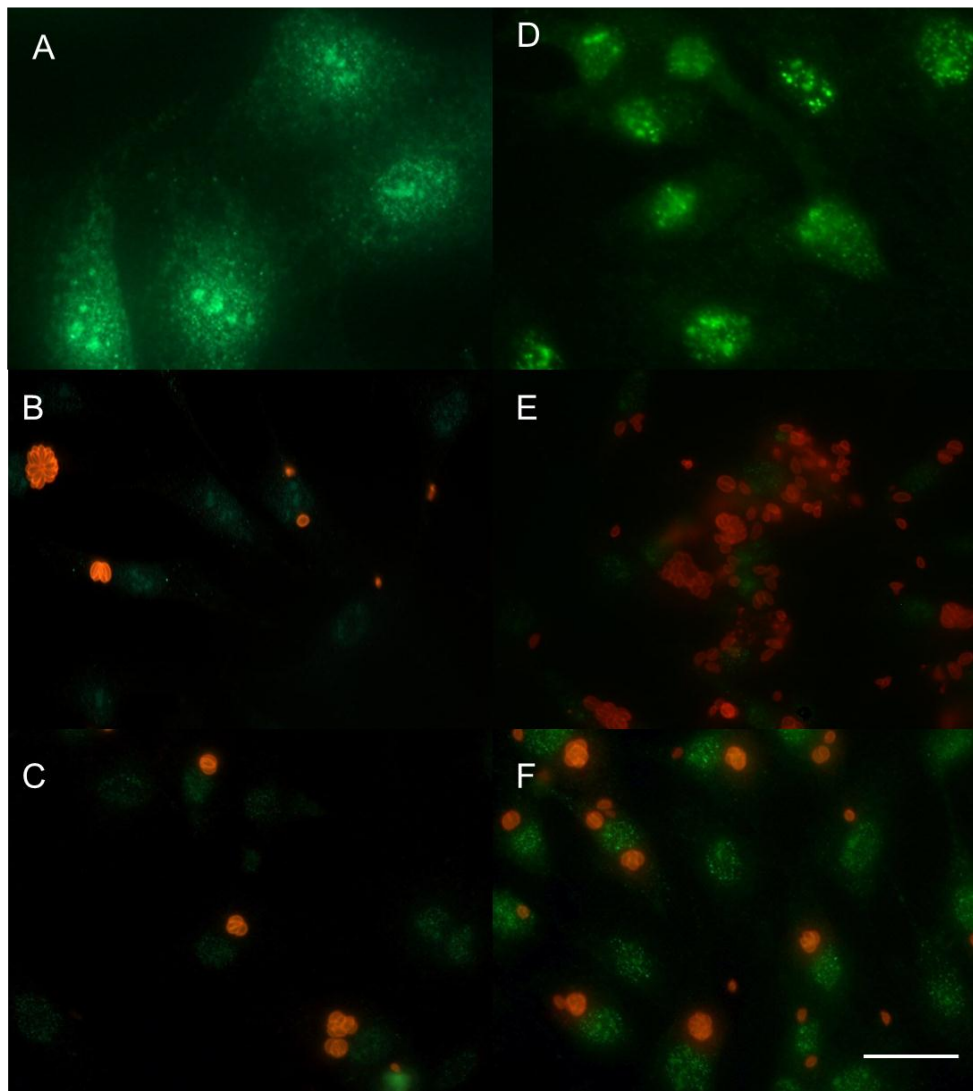


Figura 9. Infecção por *Toxoplasma gondii* de duas cepas RH e ME-49 em células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas com interferon-gama. IEC-6 imunomarcadas com anti-iNOS (verde) e anti-*T. gondii* (laranja). IEC-6 ativadas e não infectadas por 24 h (A) e 48 h (D), infectadas com *T. gondii* cepa RH por 24 h (B) e 48 h (C) e cepa ME-49 por 24 h (E) e 48 h (F). Infecção por *T. gondii* induziu menor expressão de iNOS independente das cepas, contudo, IEC-6 infectadas com ME-49 recuperaram a expressão de iNOS após 48 h de infecção. Barra: 40 μ m

5.3. Expressão citoplasmática e da degradação da enzima óxido nítrico sintase induzida em IEC-6 após infecção por *Toxoplasma gondii*

Inicialmente a expressão de iNOS nas IEC-6 apresentou marcação citoplasmática e nuclear (Figura 6 e 9). A localização da iNOS é majoritariamente citoplasmática (Vodovotz *et al.*, 1995; Bogdan, 2015), no entanto, pode ser nuclear também (Bogdan, 2015). Para nossas preparações as lamínulas foram montadas utilizando Prolonggold com DAPI obtendo marcação de núcleo em azul (Figura 10 A e B). Como a utilização do DAPI poderia provocar interferência na marcação de iNOS, conferindo cor verde aos núcleos, criando artefato de expressão de iNOS nuclear, novo experimento similar ao que foi feito inicialmente foi realizado utilizando Prolonggold sem DAPI. O uso de Prolonggold sem DAPI revelou expressão da enzima iNOS apenas no citoplasma (Figura 11 B e C e Figura 12 A e C). As células não ativadas não expressaram iNOS (Figura 11 A), células ativadas com LPS e IFN- γ mostram baixa expressão de iNOS (Figura 11 B) e alta expressão dessa enzima foi observada em células ativadas apenas com IFN- γ (Figura 11 C e 12 A). Foi confirmado que houve inibição da expressão de iNOS nas IEC-6 em razão da infecção por *T. gondii* logo após a infecção por 2 h que se manteve por 24 e 48 h (Figura 12 B, C e D). Quando as células foram infectadas por *T. gondii* apresentaram baixa expressão de iNOS, contudo, se não infectada apresentou alta expressão da enzima (Figura 12 C). Esse mecanismo é comumente observado quando analisamos a expressão da iNOS em IEC-6 após infecção por *T. gondii*.

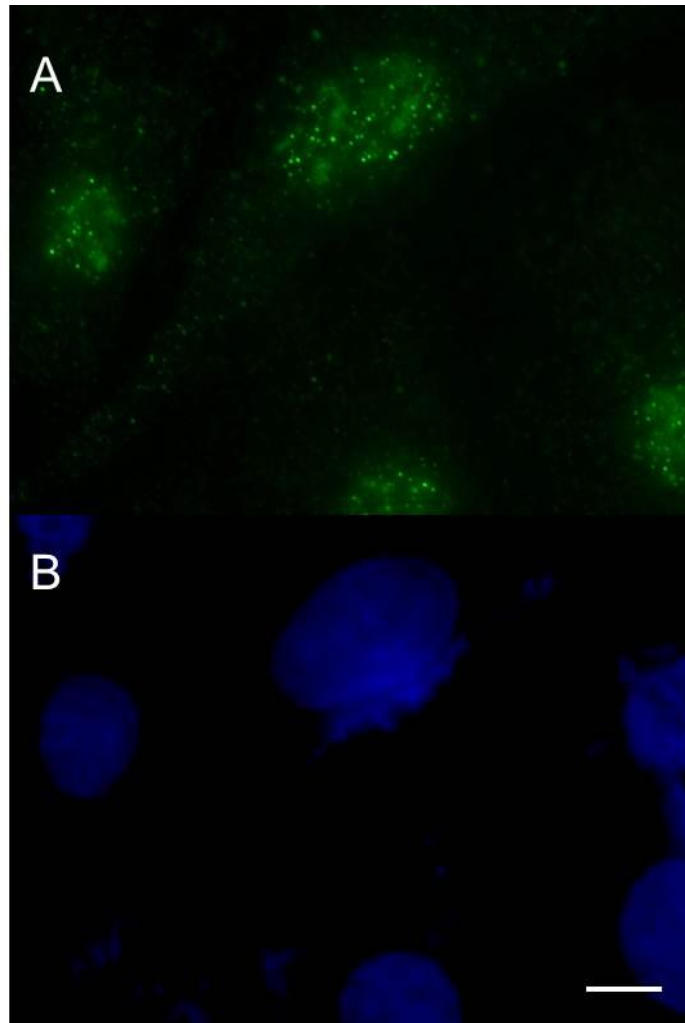


Figura 10. Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas por 24 h com interferon-gamma imunomarcadas com anti-iNOS (verde) montadas com Prolonggold com DAPI (azul). (A) IEC-6 ativadas cultivadas por 24 h. (B) Mesmo campo que a imagem “A” revelando marcação do núcleo com DAPI de IEC-6. Note alta expressão nuclear de iNOS pelas IEC-6 ativadas. Barra: 20 μ m.

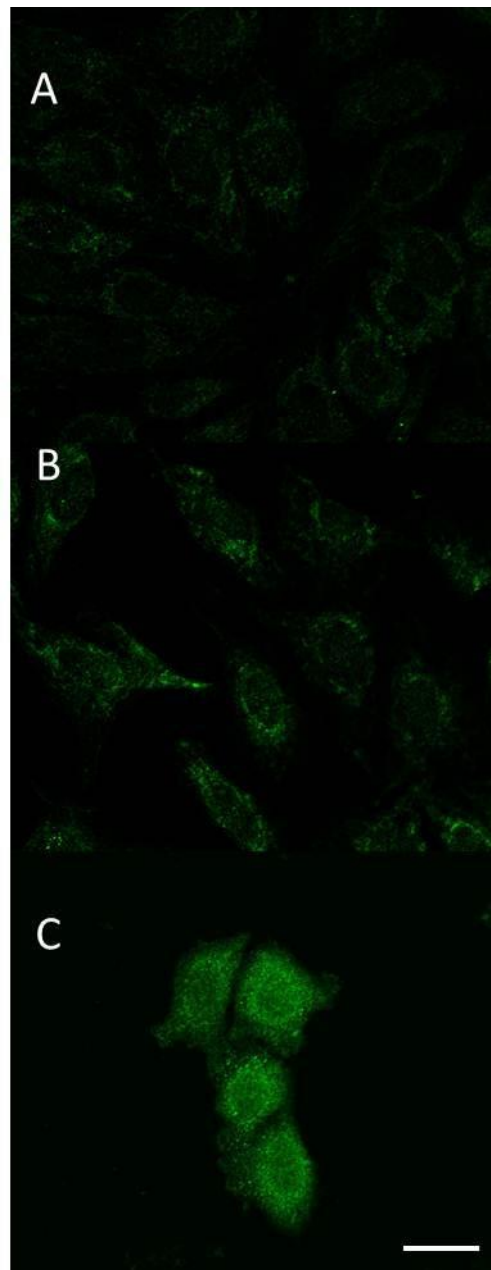


Figura 11. Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas ou não por 24 h imunomarcadas com anti-iNOS (verde) montadas com Prolonggold sem DAPI. (A) IEC-6 não ativadas. (B) IEC-6 ativadas com interferon-gamma (IFN- γ) e lipopolissacarídeo. (C) IEC-6 ativadas somente com IFN- γ . Note alta expressão citoplasmática e negativa no núcleo de iNOS pelas IEC-6 ativadas com IFN- γ . Barra: 20 μ m.

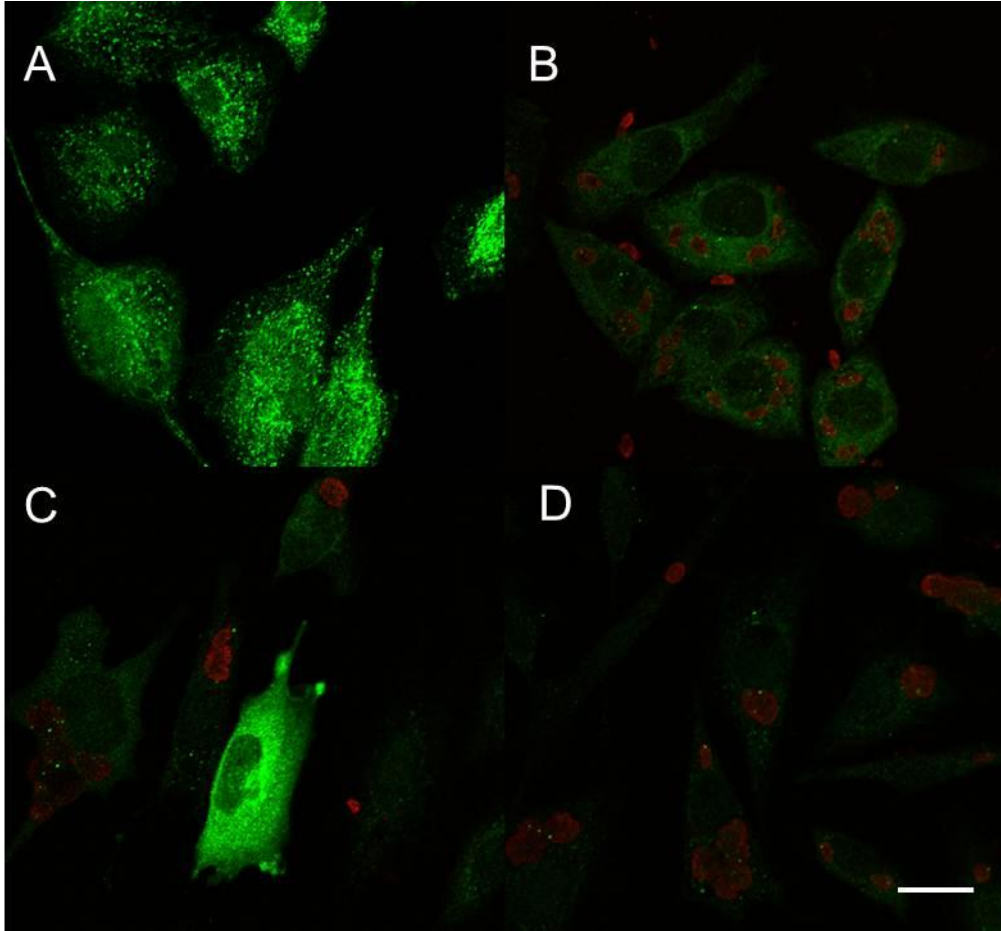


Figura 12. Células epiteliais intestinais (IEC-6) ativadas por 24 h com interferon-gamma imunomarcadas com anti-iNOS (verde) e anti-*Toxoplasma gondii* (laranja) montadas com Prolonggold sem DAPI. (A) IEC-6 ativadas, não infectadas, cultivadas por 24 h. (B) IEC-6 ativadas e infectadas por 2 h com *T. gondii*, cepa RH. (C) IEC-6 ativadas e infectadas por 24 h com *T. gondii*. (D) IEC-6 ativadas e infectadas por 48 h com *T. gondii*. Expressão citoplasmática de iNOS pelas IEC-6 foi observada após ativação sendo inibida após infecção com *T. gondii*. Barra: 20 μ m.

5.4. Ativação das IEC-6 com interferon gamma suprimiu a porcentagem de células infectadas com *T. gondii*.

Nas IEC-6 não ativadas a porcentagem de células infectadas pelo parasito aumentou com o tempo de infecção, no entanto, houve diminuição do número de células infectadas com *T. gondii* após 2, 24 e 48 h de infecção nas células ativadas (Figura 13).

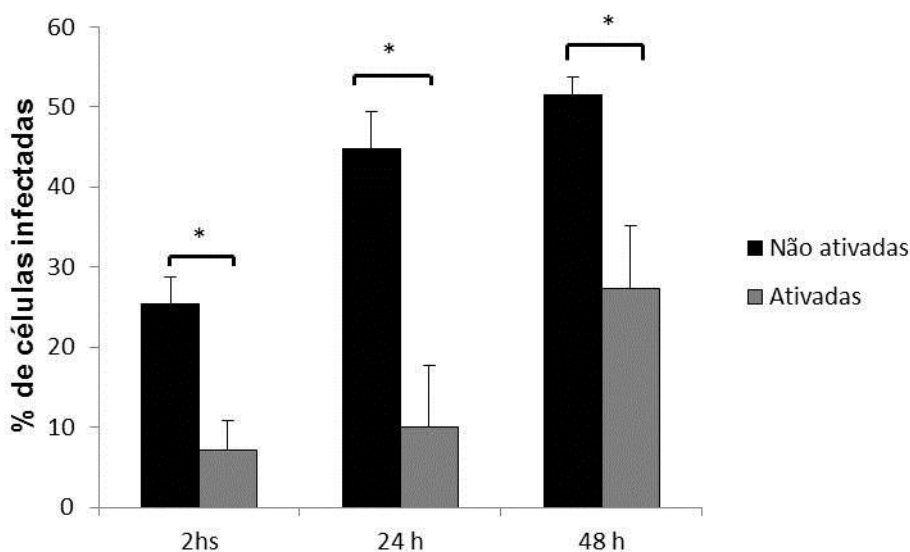


Figura 13: Desenvolvimento de *Toxoplasma gondii*, cepa RH, em células epiteliais intestinais ativadas ou não com interferon-gamma. A porcentagem de células infectadas foi significativamente menor em todos os tempos ativados com IFN- γ . Resultados expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. *Significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

5.5. Inibição do desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em IEC-6 envolveu o óxido nítrico

As células tratadas com as concentrações de 10 e 5 mM de nitro-L-arginina apresentaram maior porcentagem de células infectadas em relação as células ativadas (Figura 14 A). No entanto, as células tratadas com o inibidor apresentaram menor porcentagem de células infectadas do que as células não ativadas (Figura 14 A). O tratamento com a concentração de 1 mM de nitro-L-arginina não aumentou a porcentagem de células infectadas em relação as células ativadas e continuou menor do que as células não ativadas (Figura 14 A), indicando que o efeito do inibidor de iNOS foi dose dependente.

O tratamento com o inibidor (10, 5 e 1 mM) resultou em maior número médio de parasitos por células infectadas em relação as células ativadas (Figura 14 B). Interessantemente, o número médio das células tratadas com o inibidor foi igual as células não ativadas (Figura 14 B).

Por último comparamos entre as células ativadas, tratadas com Nitro -L-Arginina e não ativadas o índice de infecção que é a multiplicação dos dois números descritos acima. Essa análise mostrou resultado similar ao descrito para porcentagem de células infectada (Figura 14 A, C). De forma geral o índice de infecção mostrou que o tratamento com o inibidor de iNOS reduziu a capacidade microbicida das células ativadas, mas não foi suficiente para permitir o crescimento dos parasitos como nas células não ativadas (Figura 14 C).

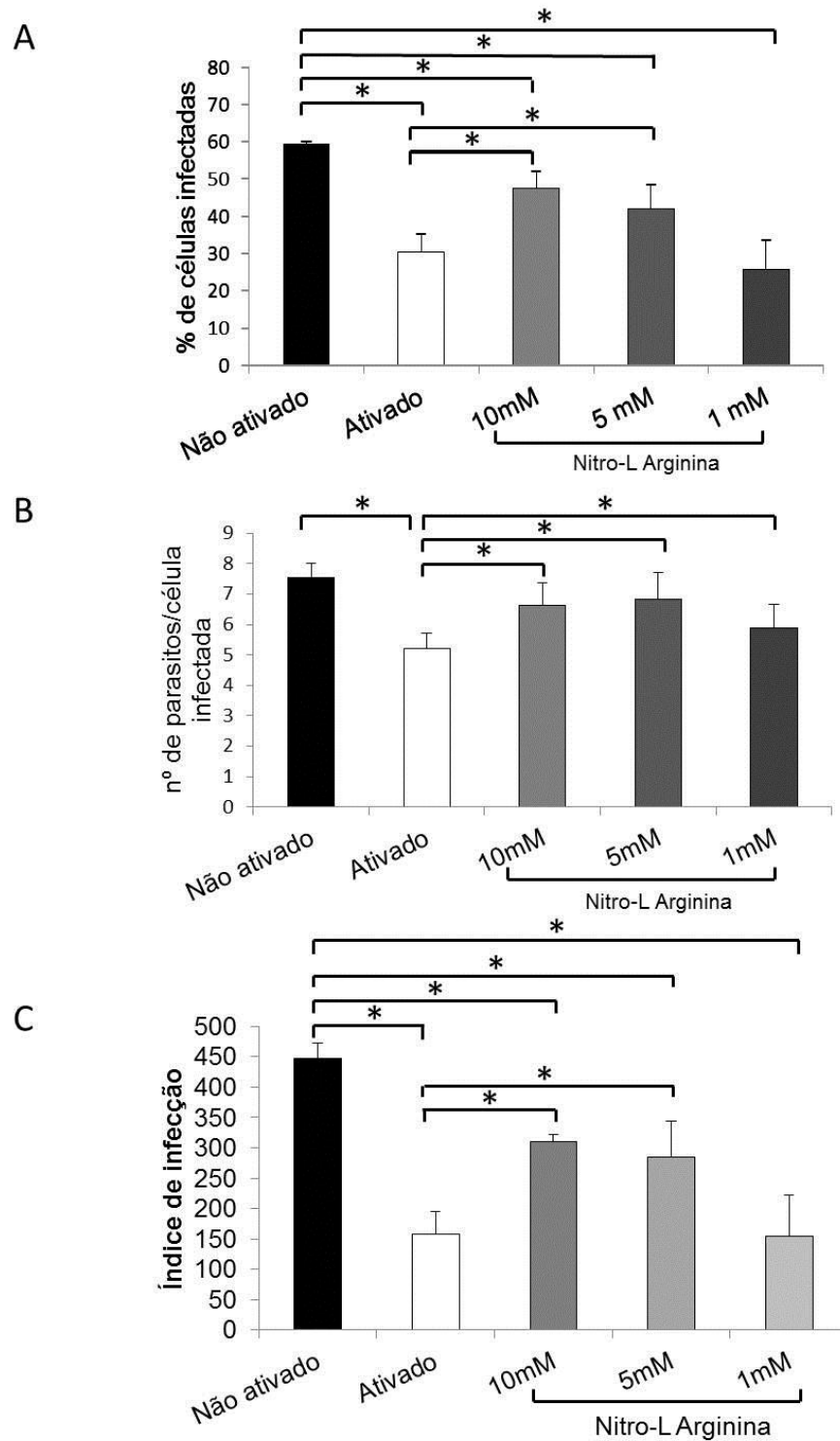


Figura 14. Desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* cepa RH em IEC-6 ativadas com interferon-gamma, tratadas ou não com o inibidor da oxido nítrico sintase induzida, nitro-L-arginina. (A) Porcentagem de células infectadas. Houve aumento da porcentagem de células infectadas após tratamento com nitro-L-arginina nas concentrações de 5 e 10 mM em comparação com células ativadas. (B) Número médio de parasitos por células infectada. Notar aumento do número médio de parasitos por célula infectada em todos os tratamentos com o inibidor em relação as células ativadas. (C) Índice de infecção. Houve aumento do índice de infecção após tratamento com nitro-L-arginina nas concentrações de 5 e 10 mM em comparação com células ativadas.

5.6. Interferon gamma induziu aumento de vesículas autofágicas em IEC-6.

Houve claro aumento na quantidade de vesículas autofágicas nas células infectadas que foram ativadas com IFN- γ . Note que a expressão das vesículas autofágicas encontra-se preferencialmente ao redor de *T. gondii* em todos os tempos de infecção nas IEC-6 ativadas. Além disso, o número de parasitos foi menor nas células ativadas (Figura 15 E, F, G, H).

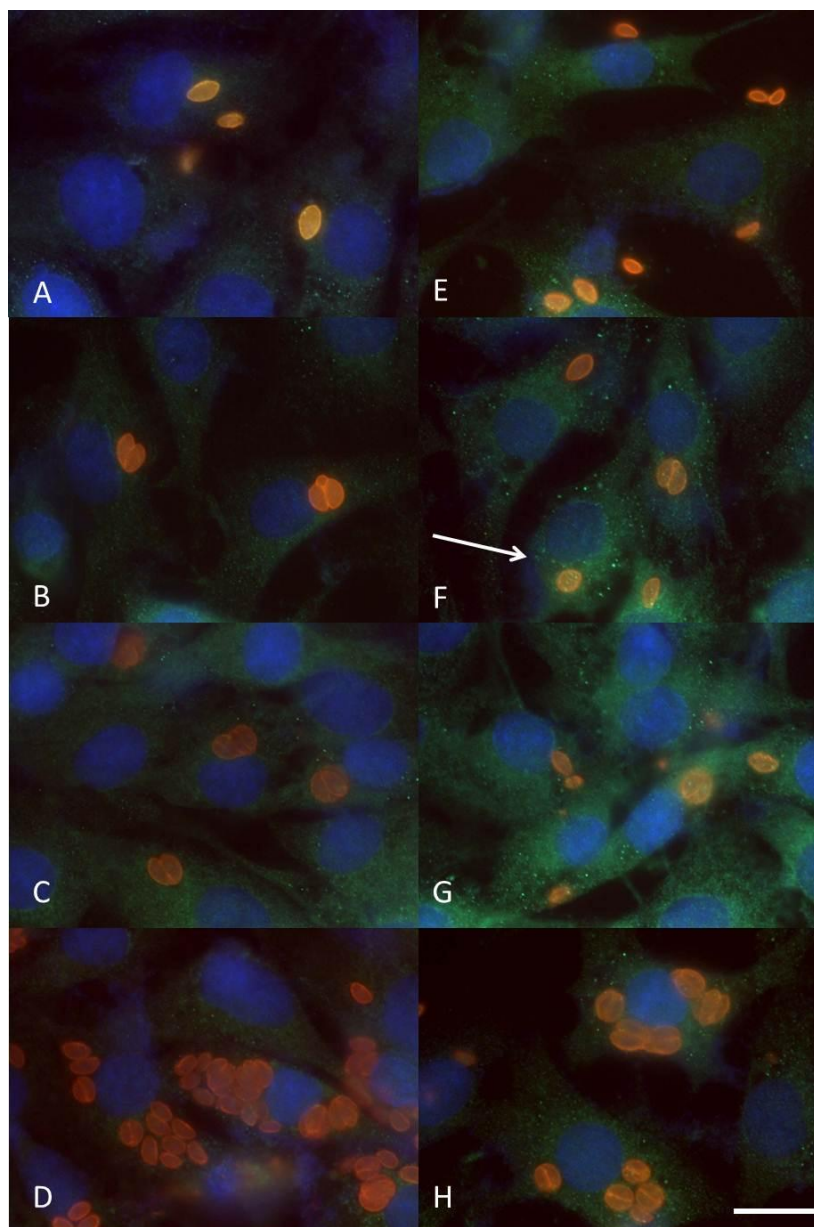


Figura 15. Células epiteliais intestinais (IEC-6) não ativadas e ativadas com interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) imunomarcadas com anti-LC3 (verde), anti-*Toxoplasma gondii* (laranja) e núcleo marcado com DAPI (azul). Células não ativadas (A, B, C e D) e ativadas com $\text{IFN-}\gamma$ (E, F, G e H) foram infectadas por 3, 6, 12 e 24 h, respectivamente, com *T. gondii*, cepa RH. Note maior número de vesículas LC3 positivas (seta) que se associaram com *T. gondii* em IEC-6 ativadas. Barra: 20 μm .

5.7. Curva de sobrevivência de animais $\text{CCR2}^{-/-}$

Para verificar se a infecção por *T. gondii* de enterócitos do íleo inibiria a expressão de iNOS, explantes desses animais foram infectados *in vitro*. O primeiro passo foi determinar a quantidade ideal de cistos para fazer a infecção oral. Animais infectados com 5 cistos de *T. gondii* sobreviveram mais que os animais infectados com 10 cistos (Figura 16). Os animais infectados com 10 cistos sobreviveram por no máximo 12 dias após a infecção (Figura 16). Quando

comparamos esses resultados com a sobrevivência de animais C57BL/6 infectados com *T. gondii* constatamos que os animais CCR2^{-/-} são mais sensíveis (dados não mostrados). Nossos resultados confirmam que a sobrevivência dos animais é dependente da dose de cistos. A partir desses resultados, definimos os dias ideais para coletar os íleos dos animais CCR2^{-/-} infectados para o experimento da infecção do explante.

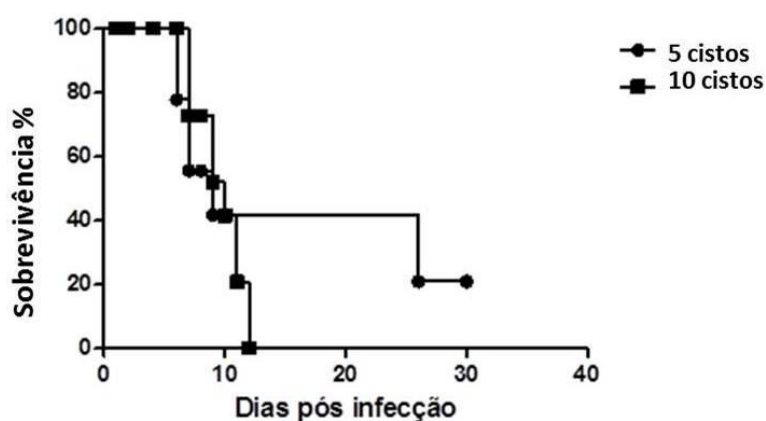


Figura 16. Sobrevivência de animais CCR2^{-/-} infectados com 5 e 10 cistos de *Toxoplasma gondii*, cepa ME-49. A carga parasitária maior reduz a sobrevivência dos animais.

5.8. Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida no íleo de animais CCR2^{-/-}

Foi observado que no terceiro dia pós-infecção as células do íleo não expressaram iNOS (Figura 17 A). O íleo obtido no 6º dia pós-infecção apresentou enterócitos expressando iNOS (Figura 17 B). No 9º dia após infecção os enterócitos do íleo apresentaram maior expressão de iNOS e as células da lâmina própria não expressaram essa enzima (Figura 17 C).

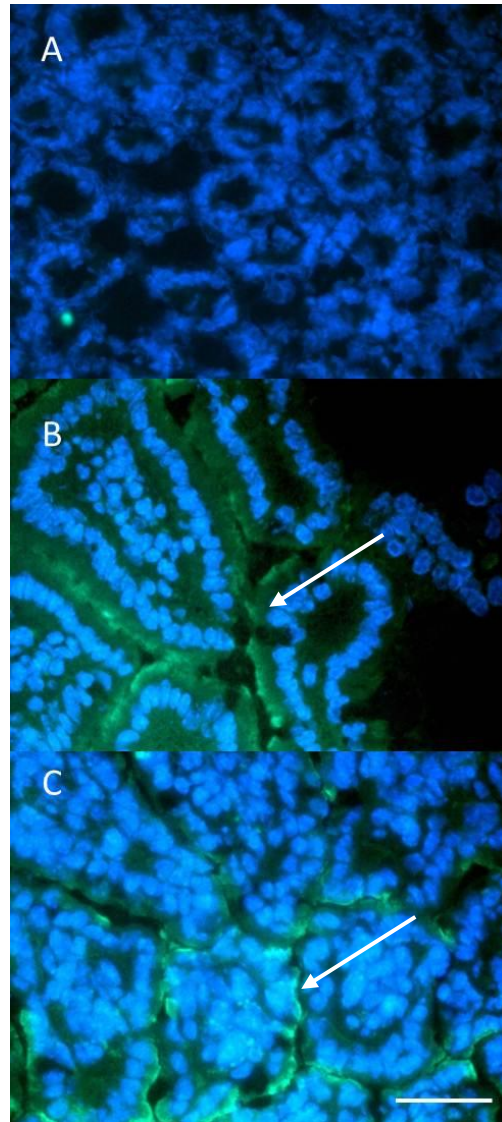


Figura 17. Expressão de iNOS no íleo de camundongos $CCR2^{-/-}$ infectados oralmente com *Toxoplasma gondii*. (A) Terceiro dia pós-infecção. (B) Sexto dia pós-infecção. (C) Nono dia pós-infecção. Note aumento da expressão de iNOS com o tempo de infecção localizada apenas nos enterócitos (setas). Barra: 20 μ m.

5.9. Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida em enterócitos de explantes de íleo de camundongos CCR2^{-/-} infectados com *Toxoplasma gondii* foi inibida após infecção com taquizoítas desse parasito.

Explante de íleo de animais previamente infectados (*in vivo*) por 7 dias foram novamente infectados *in vitro* por 3 h e a expressão de iNOS analisada. Enterócitos de explantes de íleo não infectados mantiveram expressão de iNOS (Figura 18 A e B). Após 3 h de infecção por taquizoítas de *T. gondii* a expressão de iNOS foi drasticamente reduzida nos enterócitos de explantes de íleo (Figura 18 C e D).

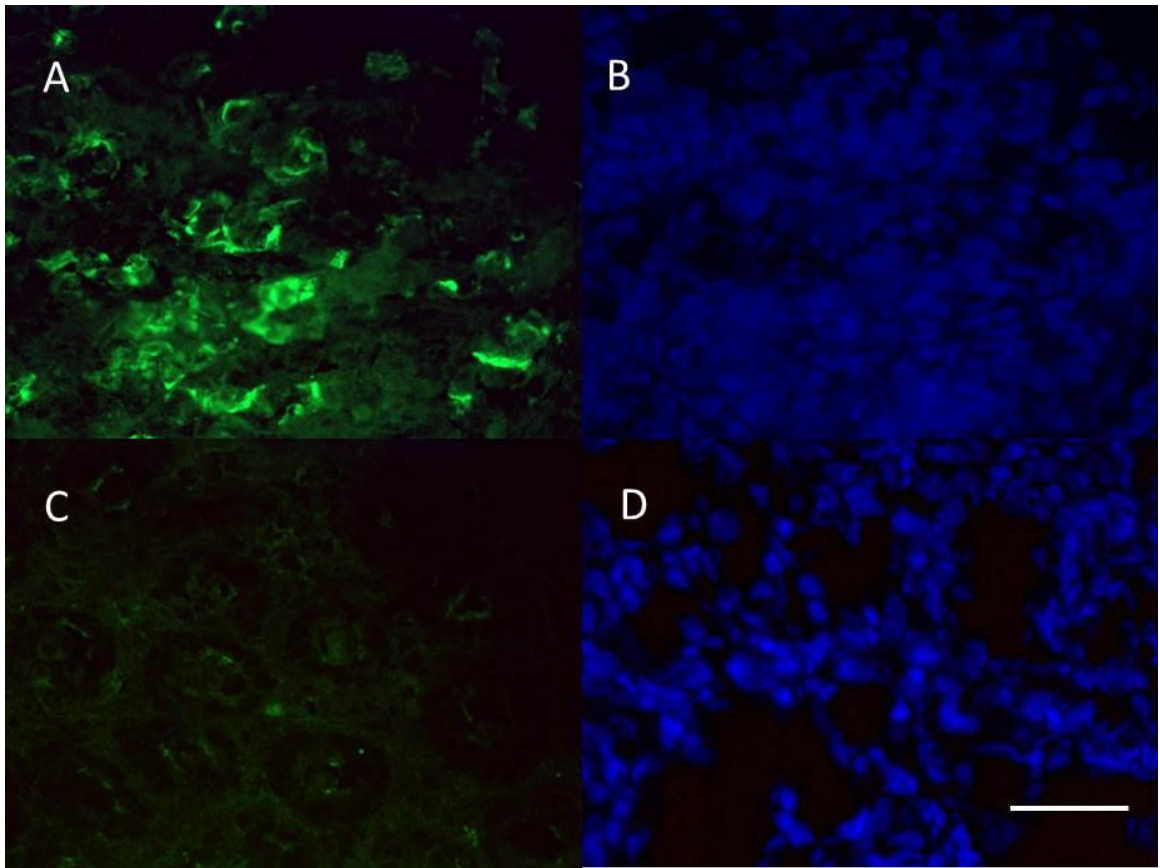


Figura 18. Cultura de explantes de íleo de camundongos $CCR2^{-/-}$ infectados oralmente por *Toxoplasma gondii* por 7 dias. (A) Explante de íleo não infectado com 3 h de cultivo marcado para iNOS (verde). (B) Marcação do núcleo das células no mesmo campo visual que “A”. (C) Explante de íleo infectado por 3 h com *T. gondii*. (D) Marcação do núcleo das células no mesmo campo visual que “C”. Note drástica diminuição na expressão de iNOS nas células que foram infectadas com *T. gondii*. Barra: 20 μ m

6. Discussão

A principal forma de contaminação de hospedeiros por *T. gondii* é a oral (Dunay *et al.*, 2008). Ao ingerir o alimento contaminado, o parasito passa pelo trato gastrointestinal e as primeiras células infectadas são as IEC. Porém, *T. gondii* não se multiplica nessas células, apenas passa por elas (Speer e Dubey, 1998). O desenvolvimento do parasito ocorre nas células da lâmina própria tais como macrófagos e DC (Speer e Dubey, 1998; Dunay *et al.*, 2008). Durante esse processo e dependendo da cepa do parasito e da linhagem de camundongos, ocorre necrose no íleo podendo levar o indivíduo à óbito. No entanto, a IEC é a célula mais resistente durante o processo inflamatório no íleo (Dunay *et al.*, 2008; Dubey *et al.*, 2012). É importante se obter maior entendimento de por que as IEC são as últimas células infectadas durante esse processo e quais são os mecanismos microbicidas frente a infecção com *T. gondii*. Aqui confirmamos que as IEC-6 expressaram iNOS e conseqüentemente produziram NO quando ativadas com IFN- γ , mas a combinação de LPS e IFN- γ não foi eficaz para essa ativação. *T. gondii* foi capaz de inibir a produção desse gás nessas células, semelhante ao mecanismo demonstrado em macrófagos (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016). Ademais, ativação por IFN- γ limitou o crescimento de *T. gondii*. Esse controle foi revertido com o bloqueio da produção de NO com Nitro-L-Arginina. Porém, esse não foi o único mecanismo envolvido. Nossos dados mostram que IEC-6 ativadas apresentaram aumento no número de vesículas autofágicas com sua organização preferencialmente ao redor dos parasito. Ademais, a expressão de iNOS por IEC do íleo de camundongos CCR2^{-/-} foi confirmada após infecção oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Outrossim, foi visto que a infecção *in vitro* por *T. gondii* dos explantes de íleo desses camundongos inibiu a expressão de iNOS nessas células.

IEC-6 produziram NO quando foram ativadas com IFN- γ apresentando níveis duas vezes mais altos de nitrito do que quando ativada com a combinação de LPS e IFN- γ . O LPS é uma endotoxina presente na membrana plasmática de organismos procariotos gram negativos (Rietschel *et al.*, 1994). LPS está presente em grandes quantidades no lúmen intestinal, pois esse é altamente colonizado com bactérias gram negativas (Flint *et al.*, 2012). Ademais, LPS é capaz de

induzir expressão de iNOS e produção de NO em macrófagos (Stuehr e Nathan, 1989). Outrossim, LPS é capaz de induzir a produção de NO em IEC-6 (Forsythe *et al.*, 2002; Stempelj *et al.*, 2007). No entanto, a concentração utilizada nesses experimentos foi de 125 (Forsythe *et al.*, 2002) ou 50 vezes mais alta (Stempelj *et al.*, 2007) que utilizado em nossos experimentos. Uma vez que o NO está envolvido na permeabilidade da membrana das IEC (Forsythe *et al.*, 2002), e grandes quantidades de LPS estão em contato com essas células no lúmen intestinal, a baixa quantidade de LPS utilizada aqui possivelmente inibiu a expressão de iNOS nas IEC-6. Novos experimentos variando a quantidade de LPS em conjunto com IFN- γ podem responder a essa suposição.

Ambas as cepas de *T. gondii* RH e Me-49 possuíram a capacidade de inibir a expressão de iNOS e a produção de NO nas IEC-6 ativadas com IFN- γ . Esse mecanismo de evasão é similar a um dos mecanismos descritos em macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016). Recentemente, nosso grupo demonstrou que não somente as cepas RH e ME-49 são capazes de inibir NO de macrófagos de camundongo, mas as cepas VEG e PBr também o fazem (Damasceno-Sá, 2013). Portanto, o fato das duas cepas usadas aqui inibirem a produção de NO de IEC-6 foi um resultado provável. Embora o NO seja caracterizado como agente microbicida contra *T. gondii* (Adams *et al.*, 1990) a similaridade na inibição da produção de NO entre macrófagos e IEC-6 indica que a capacidade de *T. gondii* de evadir a produção de NO pode ser um mecanismo semelhante em todas as células hospedeiras produtoras de NO. O exato mecanismo molecular utilizado por *T. gondii* para inibir a produção de NO em IEC-6 não é conhecido, mas pode ser dependente da via de degradação de proteossoma, conforme descrito em macrófagos infectados com esse parasito (Padrão *et al.*, 2014).

A cepa ME-49 como a RH inibiu a expressão de iNOS após 24 h de infecção das IEC-6. Mas diferente da RH, a cepa ME-49 não inibiu a expressão de INOS após 48 h de infecção havendo a re-expressão dessa enzima; esse resultado foi corroborado pela produção de NO. Novamente esse mesmo resultado foi obtido na infecção de macrófagos (Damasceno-Sá, 2013). Isso sugere que a baixa virulência dessa cepa não foi suficiente para evadir da atividade imune da célula. Essa cepa pode ser destruída por outros mecanismos

microbicidas como destruição vacuolar dependente das GTPases relacionadas a imunidade que tem sido demonstrado em macrófagos ativados (Zhao *et al.*, 2009) ou por mecanismos que envolvem autofagia (Andrade *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009; Subauste, 2009). Nesse caso, o sistema microbicida baseado na produção de NO pode ser inibido, mas outro mecanismo microbicida possivelmente atuou no parasito levando-o a morte, com conseqüente nova expressão de iNOS.

Ao ativarmos as IEC-6, nos primeiros experimentos, notamos que a expressão da iNOS era preferencialmente nuclear. Estudos do nosso grupo vêm demonstrando a importância da expressão da iNOS nos processos de infecção por *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2002, 2004; Guilherme e DaMatta., 2004; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014). Até a presente data, nenhuma das células estudadas por nosso grupo havia expressado iNOS nuclear. A localização da iNOS é preferencialmente citoplasmática (Vodovotz *et al.*, 1995; Bogdan, 2015), podendo também ser expressa no núcleo de algumas células (Bogdan, 2015). Como os resultados iniciais da expressão de iNOS em IEC-6 foram os primeiros a demonstrar tal marcação, foi feita associação de possível interferência nas reações de imunofluorescência com o uso de Prolongold com DAPI que poderia ser o causador da marcação nuclear. Para termos a certeza de que o DAPI estaria provocando interferência na imunolocalização da iNOS, experimentos similares foram realizados com uso de Prolongold sem DAPI. Notamos que nesses casos a marcação da expressão da iNOS apresentou-se apenas no citoplasma das células. Portanto, a presença do DAPI influenciou na localização da enzima. Curiosamente, essa marcação nuclear não foi vista para a iNOS em macrófagos no qual usamos os mesmos reagentes incluindo o Prolongold com DAPI. Ademais, as marcações de imunofluorescência feitas para o marcador LC3A (autofagia), também foram citoplasmáticas mesmo usando Prolongold com DAPI. Isso indica que essa marcação nuclear da iNOS é algo exclusivo nesse tipo celular e no anticorpo usado para localizar iNOS.

IFN- γ limitou o crescimento parasitário em IEC-6 por até 48 h de infecção. A inibição do crescimento de *T. gondii* nas IEC-6 foi primeiramente relatado por Dimier e Bout (1993), porém o exato mecanismo responsável por essa inibição ainda não foi completamente elucidado. Estudos mostram que o IFN- γ restringe a quantidade de ferro intracelular, sendo esse um limitador do crescimento desse parasito (Dimier e Bout 1998). Os autores relatam que nem espécies reativas de

nitrogênio e oxigênios são responsáveis pela inibição do crescimento do *T. gondii* em IEC-6 ativadas por IFN- γ (Dimier e Bout 1998). A concentração de IFN- γ utilizada por esses autores foi de 100 U/ml (Dimier e Bout 1998), nossos resultados mostram claramente que os níveis de produção de nitrito somente são relevantes a partir da concentração de 800U/ml de IFN- γ . A concentração utilizada pelos autores não foi suficiente para produzir NO e quando bloqueada com NG-monometil-L-arginina, não apresentaram resultados significativos. Ademais, observamos que a quantidade de células utilizada por poço na placa de 24 poços estava diretamente ligada aos níveis detectáveis de NO. Pois, num primeiro momento utilizamos 1×10^5 células por poço e não conseguimos detectar NO. Ao aumentarmos a concentração de células para 1×10^6 células por poço o NO foi detectado nos níveis relatados aqui. Esse pode ter sido um dos motivos pelos quais Dimier e Bout (1998) não conseguiram detectar níveis de NO, pois a quantidade de células utilizada nesse estudo foi de $2,5 \times 10^4$ células por poço. Com isso, até a presente data apenas há a confirmação do envolvimento do ferro intracelular na diminuição do crescimento de *T. gondii* nas IEC-6 ativadas por IFN- γ (Dimier e Bout 1998). No entanto, nossos resultados apontam que a produção de NO foi relevante nesse processo.

Nós comprovamos que o NO é um dos mecanismos envolvidos na inibição do crescimento de *T. gondii* em IEC-6 ativadas com IFN- γ . Isso foi demonstrado pelo uso do inibidor de iNOS. Observamos que quando as células ativadas foram tratadas com diferentes concentrações (10, 5 e 1 mM) do inibidor de iNOS, Nitro-L-Arginina, houve aumento na porcentagem de células infectadas em relação as células ativadas. Esse aumento foi significativo apenas nas concentrações de 10 e 5 mM mostrando que esse inibidor teve efeito dose dependente e que à baixas concentrações não foi eficaz. Quando comparamos o número médio de parasitos por célula infectada vimos que nas células ativadas há menor quantidade de parasitos e quando as células foram tratadas com as diferentes concentrações do inibidor de iNOS todas elas induziram crescimento significativamente diferentes das IEC-6 ativadas. Esses resultados mostraram ainda que nas células tratadas os parasitos cresceram igual as células não ativadas. Porém, ao analisarmos o índice de infecção das células vimos que os parasitos voltaram a crescer dentro das células, e que esse crescimento foi diferente das células não ativadas. Com isso podemos concluir que o NO é um importante mecanismo microbicida (Brunet,

2001), podendo matar diretamente taquizoítos de *T. gondii* por inibição de enzimas mitocondriais e enzimas nucleares essenciais (Brunet, 2001). Porém em IEC-6 não foi o principal mecanismo de inibição do crescimento de *T. gondii* indicando que outros mecanismos poderiam estar envolvidos.

Estudos recentes apontam o envolvimento da autofagia após a interação de diferentes agentes patogênicos com as células hospedeiras (Gao *et al.*, 2014). Utilizando *T. gondii* foi demonstrado que esses parasitos são controlados por processos autofágicos mediados por fagócitos profissionais e células não fagocíticas (Duszenko *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014). Células da micróglia e macrófagos medeiam a inibição do crescimento de *T. gondii* através da via CD40-CD154 (Gazzinelli *et al.*, 1993; Subauste e Wessendarp, 2006) e mais recentemente foi confirmado o envolvimento das células musculares esqueléticas como importante mecanismo de inibição do crescimento de *T. gondii* (Souto *et al.*, 2016). Portanto, investigamos se a autofagia poderia estar envolvida no processo de limitação do crescimento de *T. gondii* em IEC-6 ativadas com IFN- γ . Notamos que ao ativar as células e infectá-las com *T. gondii* por diferentes tempos, houve aumento na quantidade de vesículas autofágicas e confirmamos a diminuição no número de parasitos nas células ativadas. Além disso, essas vesículas organizavam-se preferencialmente ao redor dos parasitos. Com isso acreditamos que a autofagia também é responsável pela limitação do crescimento de *T. gondii* em IEC-6 ativadas por IFN- γ . Novos experimentos utilizando inibidor de autofagia podem revelar se esse mecanismo está envolvido no processo de controle de *T. gondii* em IEC-6 ativadas com IFN- γ . Outra forma de mostrar o envolvimento autofágico é através da caracterização ultraestrutural que pode indicar o envolvimento desse mecanismo no controle desse parasito nas IEC-6 ativadas.

IEC na estrutura arquitetônica do íleo de camundongos CCR2^{-/-} ficam positivos para iNOS após infecção oral por *T. gondii* *in vivo* diferentes dos camundongos selvagens nos quais a expressão é maior nas células da lâmina própria (Dunay *et al.*, 2008). No intuito de verificar se IEC expressando iNOS do íleo teriam a expressão dessa enzima reduzida após infecção por *T. gondii*, utilizamos o modelo de infecção *in vitro* de explantes de íleo de camundongos infectados oralmente. O primeiro passo foi reproduzir a curva de sobrevivência dos camundongos CCR2^{-/-} com diferentes quantidades de cistos de *T. gondii* da cepa ME-49. Utilizamos a infecção que induziu morte relativamente rápida dos

camundongos e verificamos que a iNOS foi expressa nas IEC do íleo desses animais após 6^o e 9^o dia pós infecção confirmando dados publicados (Dunay *et al.*, 2008). Escolhemos o 7^o dia pós-infecção oral para obter os explantes de íleo por ser um tempo no qual a expressão de iNOS seria garantida e os animais ainda estariam vivos. O íleo desses animais foi removido, infectado com *T. gondii in vitro* e a expressão de iNOS verificada no tecido. Notamos que após a infecção ocorreu a inibição da expressão da iNOS. Portanto, o fenômeno de inibição de iNOS em células infectadas por *T. gondii* ocorre em IEC que compõem o íleo. Apesar do grupo estudar o fenômeno de inibição da expressão de iNOS e redução da produção de NO em infecções de macrófagos por mais de 14 anos (Seabra *et al.*, 2002, 2004; Guilherme e DaMatta., 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá, 2013; Padrão *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016), não conseguimos demonstrar ainda que esse fenômeno pode ocorrer *in vivo*. Portanto, esse resultado foi deveras relevante, pois sugere que a inibição da expressão de iNOS e produção de NO pode de fato ocorrer no sistema tecidual no qual *T. gondii* tem que lidar durante as infecções nos diversos hospedeiros. Assim, esse resultado sugere ainda que a infecção por *T. gondii* pode mesmo ocorrer *in vivo* sendo crucial para o sucesso do parasito.

Vale ressaltar que durante a infecção por *T. gondii* as IEC-6 são as últimas células infectadas mesmo após extensa lesão no íleo. Para tal, essas células de alguma maneira necessitam inibir a proliferação desse parasito ou até mesmo mata-lo. Possivelmente as IEC-6 produzem NO *in vivo* fazendo com que a proliferação de *T. gondii* nessas células seja minimizada. Além disso, com o objetivo de minimizar o estresse sofrido e inibir o crescimento do parasito, essas células possivelmente eliminam *T. gondii* através de mecanismos autofágicos.

7. Conclusões

- As IEC-6 expressam iNOS e produzem NO quando ativadas com IFN- γ ;
- Conforme descrito em outros modelos de células e com outros parasitos, *T. gondii* é capaz de evadir do sistema microbicida de produção de NO das IEC-6, inibindo a expressão de iNOS e a produção de NO nessas células;
- IEC-6 ativadas com IFN- γ inibem crescimento de *T. gondii*, o exato mecanismo pelo qual ocorre a inibição ainda não foi totalmente elucidado, mas comprovamos que a produção de NO é importante mecanismo microbicida envolvido nesse processo. Pois, ao bloquearmos a atividade enzimática da iNOS com Nitro-L-Arginina, há o retorno do crescimento de parasitos nas IEC-6;
- Demostramos que a autofagia é um fenômeno que ocorre nas IEC-6 ativadas com IFN- γ e que as vesículas autofágicas organizam-se preferencialmente ao redor dos parasitos, demonstrando que esse fenômeno também ocorre quando as células são ativadas, sendo também caracterizado como mecanismo microbicida presente nas IEC-6;
- A infecção por *T. gondii* inibe a expressão de iNOS *in vitro* nas IEC de íleo de camundongos. Portanto, tal mecanismo de infecção pode ocorrer *in vivo* podendo ser importante para a sobrevivência de *T. gondii*.

8. Referências Bibliográficas

- Abhilash, K. P.; Roshine, M. K.; Vandana, K.; Varghese, G. M. A probable case of acquired toxoplasmosis presenting as pyrexia of unknown origin in an immunocompetent individual. *Int J Infect Dis.* 17.11: e1067-e1068, 2013.
- Adams, L. B.; Hibbs, J. B.; Taintor, R. R.; Krahenbuhl, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine, *J. Immunol.* 144, 2725–2729, 1990.
- Agarraberes, F.; Terlecky, S.; Dice, J. F. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol.* 137: 825-834, 1997.
- Almeida, I. C.; Camargo, M. M.; Procopio, D. O.; Silva, L. S.; Mehlert, A.; Travassos, L. R. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 19:1476–1485, 2000.
- Amorim, G. C. A.; Orefice, F.; Oliveira, L. C.; Gomes, A. B.; Franca, M.; Amorim, G. F. C. A. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in northeastern Brazil. *Ophth. Epidemiol* 11: 301–317, 2004.
- Andrade, R. M.; Wessendarp, M.; Gubbels, M. J.; Striepen, B.; Subauste, C. S. CD40 induces macrophage anti- *Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* 9: 2366 – 2377, 2006.
- Axelrod, S.; Oschkinat, H.; Enders, J.; Shlegel, B.; Brinkmann V.; Kaufmann, S. H.; Haas, A.; Schaible, U. E. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol.* 10:1530–1545, 2008.
- Bahia-Oliveira, L. M.; Jones, J. L.; Azevedo-Silva, J.; Alves, C. C.; Orefice, F.; Adiss, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect. Dis.* 1: 55-62, 2003.
- Barragan, A.; Sibley, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* 195: 1625–1633, 2002.
- Barraud, N.; Kelson, M. J.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Curr. Pharm. Des.* 21: 21–42, 2014.
- Bauckman, K. A.; Owusu-Boaitey, N.; Mysorekar, I. U. "Selective autophagy: Xenophagy." *Methods*, 75: 120–127. 2014.
- Benjamin, J. L.; Sumpter, R. Jr.; Levine, B.; Hooper, L. V. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell Host Microbe* 13: 723–734. 2013.
- Bestebroer, J.; V'kovski, P.; Mauthe, M.; Reggiori, F. Hidden behind autophagy: the unconventional roles of ATG proteins. *Traffic* 14: 1029–1041. 2013.
- Blader, I. J.; Saeij, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS.* 117: 458–476, 2009.
- Bliss, S. K; Marshall, A. J; Zhang, Y; Denkers, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 α and -1 β in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol.*; 162:7369–7375, 1999.

- Bloushtain-Qimron, N.; Yao, J.; Shipitsin, M.; Maruyama, R.; Polyak, K. Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells. *Cell Cycle*. 8: 809-817, 2009.
- Bogdan, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 11: 66–75, 2001.
- Bogdan, C. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in the immune system. In *The Immune Response to Infection*. ASM Press 12: 69–84. 2011.
- Bogdan, C. The function of nitric oxide in the immune system. In *Handbook of Nitric Oxide* 143: 443–492. 2000.
- Bogdan, C.; Rollinghoff, M.; Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12:64-76. 2000.
- Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* 36:161-78, 2015.
- Boothroyd, J. C.; Dubremetz, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology.* 6: 79-88. 2008.
- Branchu, P.; Matrat, S.; Varelle, M.; Garrivier, A.; Durand, A.; Crépin, S.; Harel, J.; Jubelin, G.; Gobert, A. P. NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog.* 10:1003874. 2014.
- Brunet, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1457–1467. 2001
- Buzzoni-Gatel, D.; Schulthess, J.; Menard, C. L.; Kasper, H. L. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol.* 8: 535–544, 2006.
- Buzoni-Gatel D.; Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* 10:448-52. 2006
- Bradfute, S. B.; Castillo, E. F.; Arko-Mensah, J.; Chauhan, S.; Jiang, S.; Mandell, M.; Deretic, V. Autophagy as an immune effector against tuberculosis. *Curr Opin Microbiol.* 3:355-65..05.003. 2013.
- Cader MZ.; Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut.* 11:1653-64. 2013.
- Cadwell, K.; Patel, K. K.; Maloney, N. S.; Liu, T. C.; Ng, A. C.; Storer, C. E.; Head, R. D.; Xavier, R.; Stappenbeck, T. S.; Virgin, H. W. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene *Atg16L1* phenotypes in intestine. *Cell* 141: 1135–1145. 2010.
- Cohen S. B.; Denkers, E. Y.; Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. *Mucosal Immunol.* 4:744-52. 2014
- Chang, K.; Lee, S. J.; Cheong, I.; Billiar, T. R.; Chung, H. T.; Han, J. A.; Kwon, Y. G.; Ha, K. S.; Kim, Y. M. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of IkappaB. *Exp Mol Med.* 36: 311-324, 2004.
- Chiang, H.; Terlecky, S.; Plant, C.; Dice, J. F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science.*246: 382-385, 1989.
- Choi, J.; Park, S.; Biering, S. B.; Selleck, E.; Liu, C. Y.; Zhang, X.; Fujita, N.; Saitoh, T.; Akira, S.; Yoshimori, T.; Sibley, L. D.; Hwang, S.; Virgin, H. W. The parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii* is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy. *Immunity* 40: 924-935, 2014.

- Chokshi, N. K.; Guner, Y. S.; Hunter, C. J.; Upperman, J. S.; Grishin A.; Ford H. R. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 32: 92-99. 2008.
- Cuervo, A. M.; Dice, J. F.; Knecht, E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem.*, 272: 5606-5615, 1997.
- Da Gama, L. M.; Ribeiro-Gomes, F. L.; Guimarães Jr, U.; Arnholdt, A. C. V. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection*. 6:1287-1296.2004.
- Damasceno-Sá, J. C. Mecanismos de evasão do *Toxoplasma gondii* frente a macrófagos ativadas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, 2013.
- Davis, A. S.; Vergne, I.; Master, S. S.; Kyei, G. B.; Chua, J.; Deretic, V. Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLOS Pathog* 3: 1887–1894. 2007.
- Dayakar, A.; Chandrasekaran, S.; Veronica, J.; Sundar, S.; Maurya, R. In vitro and in vivo evaluation of anti-leishmanial and immunomodulatory activity of Neem leaf extract in *Leishmania donovani* infection. *Experimental Parasitology*. 153: 45-54, 2015.
- Denkers, E. Y.; Gazzinelli, R. T. Regulation and function of T cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.*; 11: 569–588, 1998.
- Deretic, V.; Levine, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*. 5:527–549. 2009.
- Dice, J. F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.*, 15: 305-309, 1990.
- Dimier, I. H.; Bout, D. T. Inhibition of *toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells. *Immunol Cell Biol*. 75: 511-4.1997.
- Dimier, I. H.; Bout, D. T. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology*. 94: 488–495, 1998.
- Dimier, I. H.; Bout, D. T. Rat intestinal epithelial cell line IEC-6 is activated by recombinant interferon-gamma to inhibit replication of the coccidian *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Immunol*. 23: 981-983, 1993.
- Dubey J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 7:1019-24. 1998.
- Dubey, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 126:57, 2004.
- Dubey, J. P. The history and life-cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss, LM.; Kim, K., editors. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspective and Methods. Academic Press; San Diego: 2007. p. 1-17.
- Dubey, J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. CRC Press, Taylor and Francis Group; 2010.
- Dubey, J. P.; Lago, E. G.; Gennari, S. M.; Su, C.; Jones, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139:1375–1424, 2012.
- Dubey, J. P.; Lindsay, D. S.; Speer, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol* .2:267-299, 1998.
- Duszenko M.; Ginger M.L.; Brennand A.; Gualdrón-López M.; Colombo M.I.; Coombs G.H.; Coppens I.; Jayabalasingham B.; Langsley G.; de Castro

- S.L.;Menna-Barreto R.; Mottram J.C.; Navarro M.; Rigden D.J.; Romano P.S.; Stoka V.; Turk B.; Michels P.A. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2:127-58. 2011.
- Duque, T. L. A.; Souto, X. M.; De Andrade-Neto, V. V.; Ennes-Vidal, V.; Menna-Barreto, R. F. S. Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A Molecular, Biochemical and Morphological Review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections. *Immunology and Mycrobiology*. 289-319.2013.
- Dunay, I. R.; Damatta, R. A.; Fux, B.; Presti, R.; Greco, S.; Colonna, M.; Sibley, L. D. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2:306-17. 2008.
- Egan, C. E.; Cohen, S. B.; Denkers, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunol Cell Biol*. 90: 668–675, 2012.
- Esch, K. J.; Petersen, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol* 1:58-85.2013.
- Fang, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Immunol*. 2:820–832, 2004.
- Feng, H. M.; Walker, D. H. Mechanisms of intracellular killing of *Rickettsia conorii* in infected human endothelial cells, hepatocytes, and macrophages. *Infect. Immun*. 68, 6729–6736, 2000.
- Ferguson, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.104: 133-148, 2009.
- Fischer, T. D.; Wang, J, H.; Vlada, A.; Kim, J. S.; Behrns, K. E. Role of autophagy in differential sensitivity of hepatocarcinoma cells to sorafenib. *World J Hepatol*. 10:752-8, 2014.
- Flint, H. J.; Scott, K, P.; Louis, P.; Duncan, S. H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 9:577-89, 2012.
- Flores-Villegas AL.; Salazar-Schettino P.M.; Córdoba-Aguilar A.; Gutiérrez-Cabrera A.E.; Rojas-Wastavino G.E.; Bucio-Torres M.I.; Cabrera-Bravo M. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. *Bull Entomol*. 5:523-32. 2015.
- Forsythe, R. M.; Xu, D. Z.; Lu, Q.; Deitch, E. A. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock*. 3:180-4. 2002.
- Foureau, D. M.; Mielcarz, D. W.; Menard, L. C.; Schulthess, J.; Werts, C.; Vasseur, V.; Ryffel, B.; Kasper, L. H.; Buzoni-Gatel, D. TLR9-Dependent Induction of Intestinal α -Defensins by *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*.184 :7022-7029. 2010.
- Francia M.E.; Dubremetz J.F.; Morrissette N.S. Basal body structure and composition in the apicomplexans *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Cilia*. 5:3. 2016.
- Frenkel, J. K.; Pfefferkorn, E. R.; Smith, D. D.; Fishback, J. L. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. *Am. J. Vet. Res.*, 52:759–763, 1991.
- Frucht, D. M.; Fukao, T.; Bogdan, C.; Schindler, H.; O'Shea, J. J.; Koyasu, S. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*.10:556-60, 2001.
- Ganley, I. G.; Lam du, H.; Wang, J.; Ding, X.; Chen, S.; Jiang, X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*;284:12297-305, 2009.

- Gao D.; Zhang J.; Zhao J.; Wen H.; Pan J.; Zhang S.; Fang Y.; Li X.; Cai Y.; Wang X.; Wang S. Autophagy activated by *Toxoplasma gondii* infection in turn facilitates *Toxoplasma gondii* proliferation. *Parasitol.* 6:2053-8. 2014.
- Gazzinelli, R. T.; Hieny, S.; Wynn, T.; Wolf, S.; Sher, A. IL-12 is required for the T-cell independent induction of IFN-g by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 90:6115–6119, 1993.
- Gharekhani, J. *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Animals in Hamedan, Iran: A Sero-Epidemiological Study. *Veterinary Medicine.* 71 .1. 68-72, 2014.
- Goldman, R. D.; Khuon, S.; Chou, Y. H.; Opal, P.; Steinert, P. M. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol.*134: 971-983, 1996.
- Gookin, J. L.; Chaing, S.; Allen, J.; Armstrong, M. U.; Stauffer, S. H.; Finnegan, C.; Murtaugh, N. F. - α B- mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:164-174, 2006.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*1 26:131-138. 1982.
- Guclu, Z.; Karaer, Z.; Babür, C.; Kiliç, S. Investigation of *Toxoplasma gondii* antibodies in sport horses bred in Ankara province. *Turkiye. Parazitolo. Derg.* 31: 264- 267, 2007.
- Guglielmo, S.; Cortese, D.; Vottero, F.; Rolando, B.; Kommer, P. V.; Williams, D. L.; Fruttero, R.; Gasco, A. New praziquantel derivatives containing NO-donor furoxans and related furazans as active agents against *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 84:135-145. 2014.
- Guilliams, M.; Movahedi, K.; Bosschaerts, T.; VandenDriessche, T.; Chuah, M. K.; Hérin, M.; Acosta-Sanchez, A.; Ma, L.; Moser, M.; Van Ginderachter, J. A.; Brys, L.; De Baetselier, P.; Beschin, A. IL-10 Dampens TNF/Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cell-Mediated Pathogenicity during Parasitic Infection. *Jornal Immunology.*182: 1107-1118.2009.
- Guillermo, L. V.; DaMatta, R. A. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poult Sci.* 5:776-82. 2004.
- Habibi, G. R.; Imani, A. R.; Gholami, M. R.; Hablolvarid, M. H.; Behroozikhah, A. M.; Lotfi, M. Detection and identification of *Toxoplasma gondii* type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin province of Iran. *Iran. J. Parasitol.* 7: 64-72, 2012.
- Hayashi-Nishino, M.; Fujita, N.; Noda, T.; Yamaguchi, A.; Yoshimori, T.; Yamamoto, A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biol* 11:1433–1437, 2009.
- He, C.; Baba, M.; Cao, Y.; Klionsky, D. J. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 19:5506–16,2008.
- He, C.; Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 43:67-93.2009.
- Herbst, S.; Schaible, U. E.; Schneider, B. E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS ONE* 6, e19105, 2011.
- Holland, G. N.; Muccioli, C.; Silveira, C.; Weisz, J. M.; Belfort, R. Jr.; O'Connor, G. R. Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis,

- in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol*, 128: 413-420, 1999.
- Halonen, S. K.; Weiss, L. M. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 114:125-145, 2013.
- Hou, B.; Benson, A.; Kuzmich, L.; De Franco, A. L.; Yarovinsky, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.; 108:278–283, 2011.
- Hwang, S.; Maloney, N. S.; Bruinsma, M. W.; Goel, G.; Duan, E.; Zhang, L.; Shrestha, B.; Diamond, M. S.; Dani, A.; Sosnovtsev, S. V.; Green, K. Y.; Lopez-Otin, C.; Xavier, R. J.; Thackray, L. B.; Virgin, H. W. Nondegradative role of Atg5-Atg12/ Atg16L1 autophagy protein complex in antiviral activity of interferon gamma. *Cell Host Microbe*. 4:397-409. 2012.
- Howard, J. C.; Hunn, J. P.; Steinfeldt, T. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol*. 14, 414–421, 2011.
- Hunter, C. A.; Sibley, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*. 11:766-78. 2012.
- Jones, J. L.; Lopez, A.; Wilson, M.; Schulkin, J.; Gibbs, R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*; 56: 296–305, 2001.
- Jones-Carson, J.; Laughlin, J.; Hamad, M. A.; Stewart, A. L.; Voskuil, M. I.; Vázquez-Torres, A. Inactivation of [Fe-S] metalloproteins mediates nitric oxide-dependent killing of *Burkholderia mallei*. *PLoS One*. 4:1976. 2008.
- Joven, J.; Guirro, M.; Mariné-Casadó, R.; Rodríguez-Gallego, E.; Menéndez, J. A. Autophagy Is an Inflammation-Related Defensive Mechanism Against Disease. In: *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases- Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics*. Springer International Publishing, p. 43-59, 2014.
- Jyoti, A.; Singh, A. K.; Dubey, M.; Kumar, S.; Saluja, R.; Keshari, R. S.; Verma, A.; Chandra, T.; Kumar, A.; Baipai, V. K.; Barthwal, M. K.; Dikshit, M. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing. *Antioxid Redox Signal*. 20, 417–431, 2014.
- Keklikoglu, N.; Koray, M.; Kocaelli, H.; Akinci, S. iNOS Expression in Oral and Gastrointestinal Tract Mucosa. *Dig Dis Sci*. 53:1437–1442, 2008.
- Kijlstra, A.; Jongert, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*. 38:1359-1370, 2008.
- Kim, B. H.; Shenoy, A. R.; Kumar, P.; Bradfield, C. J.; MacMicking, J. D. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host Microbe* 12, 432–444, 2012.
- Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8:931–37, 2007.
- Klionsky, D. J.; Abdalla, F. C.; Abeliovich, H. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* ;8:445-544, 2012.
- Kolios, G.; Rooney, N.; Murphy, C. T.; Robertson, D. A. F.; Westwick, J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T-lymphocyte derived cytokines. *Gut* 43: 56–63. 1998.
- Kone, B. C.; Kuncewicz, T.; Zhang, W.; Yu, Z. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 285:178–90, 2003.
- Kraft, C.; Peter, M.; Hofmann, K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature Cell Biol*. 12:836–841, 2010.

- Kroemer, G.; Marino, G.; Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 40:280–293, 2010.
- Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection: how, why, when, and where? *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 1: 107-120, 1997.
- Levine, B.; Mizushima, N.; Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, January 20; 469: 323–335, 2011.
- Li, W. W.; Li, J.; Bao, J. K. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life.*, v.69, p.1125-1136, 2012.
- Li, X.; Ye, Y.; Zhou, X.; Huang, C.; Wu, M. Atg7 enhances host defense against infection via downregulation of superoxide but upregulation of nitric oxide. *J. Immunol.* 194, 1112–1121, 2015.
- Liesenfeld, O.; Press, C.; Flanders, R.; Ramirez, R.; Remington, J. S. Study of Abbott Toxo IMx system for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M toxoplasma antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 10:2526-30. 1996.
- Liesenfeld, O. Oral infection C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect Dis.* 185: 96-101.2002.
- Liu, C. H.; Fan, Y. T.; Dias, A.; Esper, L.; Corn, R. A.; Bafica, A. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol.*; 177:31–35, 2006.
- Lu, W.; Schwarzer, N. J.; Du, J.; Gerbig-Smentek, E.; Andrade, S. L.; Einsle, O. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 18395–18400, 2012.
- Lyons, R. C. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 60:323–371, 1995.
- Lyons, R. E.; McLeod, R.; Roberts, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitology.* 18: 198-201.2002.
- MacMicking, J. D.; North, R. J.; LaCourse, R.; Mudgett, J. S.; Shan, S. K.; Nathan, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 5243–5248, 1997.
- Machala L.; Kodym P.; Malý M.; Geleneky M.; Beran O.; Jilich D. Toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2:59-65. 2015.
- Madara, J. L. Epithelia: biologic principles of organization. *Gastroenterology.*141-157, 1995.
- Mastrogiannaki, M.; Matak, P.; Keith, B.; Simon, M. C.; Vaultont, S.; Peyssonnaud C. HIF 2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest.* 119: 1159-1166, 2009.
- Mattila, J. T.; Ojo, O. O.; Kepka-Lenhart, D.; Marino, S.; Kim, J. H.; Eum, S. Y.; Via, L. E.; Barry, C. E. 3rd.; Klein, E.; Kirschner, D. E.; Morris, S. M. Jr.; Lin, P. L.; Flynn, J. L. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. *J. Immunol.* 191, 773–784, 2013.
- Mayer, B. Structure and function of nitric oxide synthase. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 2:390-91, 1998.
- Mercier, C.; Cesbron-Delauw, M. F. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol.* 31:60-71, 2015.

- Mimica, F.; Muñoz-Zanzi, C.; Torres, M.; Padilla, O. Toxoplasmosis, zoonosis parasitaria prevalente en Chile: recuento y desafíos. *Rev Chilena Infectol* 2015; 32 (5): 541-549, 2015.
- Miranda, F. J.; Damasceno-Sá, J. C.; DaMatta, R. A. Development of ostrich thrombocytes and monocyte-derived macrophages in culture and the control of *Toxoplasma gondii* reproduction after macrophage activation. *Poult. Sci.* 95: 12-8, 2016.
- Mizushima, N.; Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 6:542-5. 2007.
- Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.*; 140:313–326, 2010.
- Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965–1976, 2004.
- Motard, A.; Landau, I.; Nussler, A.; Grau, G.; Baccam, D.; Mazier, D.; Targett, G. A. The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol.* 15: 21-26, 1993.
- Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 3:331–341, 2003.
- Musial, A.; Eissa, T. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem*; 26:24268–73, 2001.
- Nairz, M.; Schleicher, U.; Schroll, A.; Sonnweber, T.; Theurl, I.; Ludwiczek, S.; Talasz, H.; Brandacher, G.; Moser, P. L.; Muckenthaler, M. U.; Fang, F. C.; Bodgan, C.; Weiss, G. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin- 1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *J. Exp. Med.* 210, 855–873, 2013.
- Nathan, C.; Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8841–8848, 2000.
- Neutra, M.; Louvard, D. Differentiation of intestinal cells in vitro. In: *Functional epithelial cells in culture.* 12: 363–398, 1989.
- Nicolle, C.; Manceaux, L. Sur une infection á corps de Leishman (ou organisme voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 147: 763, 1908.
- Obara, K.; Sekito, T.; Niimi, K.; Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 Complex Is Recruited to Autophagic Membranes via Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Exerts an Essential Function. *J Biol Chem.*; 283: 23972-80, 2008.
- Padrão, J. C.; Cabral, G. R. A.; da Silva, M. F. S.; Seabra, S. H.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. *Parasitology International* 63:659–663, 2014.
- Phelps, E. D.; Sweeney, K. R.; Blader, I. J. *Toxoplasma gondii* rhoptry discharge correlates with activation of the early growth response 2 host cell transcription factor. *Infect Immun* 76: 4703–4712, 2008.
- Pitman, R. S.; Blumberg, R. S. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J. Gastroenterology* 35:805-814, 2000.
- Podolsky, D. K.; Gerken, G.; Eyking, A.; Cario, E. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology.* 137: 209-220, 2009.
- Quaroni, A.; Tian, J. Q.; Goke, M.; Podolsky, D. K. Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol.* 277: 1027–1040, 1999.

- Quaroni, A.; Wands, J.; Trelstad, R. L.; Isselbacher, K. J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine: characterization by morphologic and immunologic criteria. *Cell Biol.* 80: 248-265, 1979.
- Rao, J. N.; Platoshyn, O.; Golovina, V. A.; Liu, L.; Zou, T.; Marasa, B. S.; Turner, D. J.; Yuan, J. X. J. TRPC1 functions as a store-operated Ca^{2+} channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding. *Am J Physiol Gastroenterol*; 14: 348-353, 2008.
- Richardson, A. R.; Payne, E. C.; Younger, N.; Karlinsey, J. E.; Thomas, V. C.; Becker, L. A.; Navarre, W. W.; Castor, M. E.; Libby, S. J.; Fang, F. C. Multiple targets of nitric oxide in the tricarboxylic acid cycle of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Cell Host Microbe* 10, 33–43, 2011.
- Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A. J.; Zähringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 2:217-25, 1994.
- Rodriguez-Boulan, E.; Powell, S. K. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 8:395-427, 1992.
- Sabin, A. B.; Feldman, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoan Parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 2815:660-3, 1948.
- Saeij, J. P.; Collier, S.; Boyle, J. P.; Jerome, M. E.; White, M. W.; Boothroyd, J. C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445: 324–327, 2007.
- Saitoh, T.; Akira, S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol.*; 189:925–935, 2010.
- Salvador, N.; Aguado, C.; Horst, M.; Knecht, E. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem.*, v.275, p.27447-27456, 2000.
- Santos, T. A.; Portes, J. A.; Damasceno-Sá, J. C.; Caldas, L. A.; Souza, W. D.; Damatta, R. A.; Seabra, S. H. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS One.* 6(11):e27867, 2011.
- Scanga, C. A.; Aliberti, J.; Jankovic, D.; Tilloy, F.; Bennouna, S.; Denkers, E. Y.; Medzhitov, R.; Sher, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol.*; 168:5997–6001, 2002.
- Seabra, S. H.; Souza, W.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* Partially Inhibits Nitric Oxide Production of Activated Murine Macrophages. *Experimental Parasitology.* 100: 62–70, 2002.
- Seabra, S. H.; Souza, W.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine that induces a TGF- β autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun*; 324:744–52, 2004.
- Seipel, D.; Gomes, F. L. R.; Barcelos, M. W.; Ramalho, A. V.; Kanashiro, M. M.; Arnholdt, T. L. K. C. V. Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability. *APMIS.* 117:672-680, 2009.
- Selleck, E. M.; Fentress, S. J.; Beatty, W. L.; Degrandi, D.; Pfeffer, K.; Virgin, H. W. 4th.; Macmicking, J. D.; Sibley, L. D. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 9, e1003320, 2013.

- Sher, A.; Oswald, I. O.; Hieny, S.; Gazzinelli, R. T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in NK cells which requires both adherent accessory cells and TNF- α . *J Immunol.*; 150:3982–3989, 1993.
- Sibley, J. D. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 9:581–586, 2003.
- Sibley, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol. Rev.* 240, 72–91, 2011.
- Silver, K.; Desormaux, A.; Freeman, L. C.; Lillich, J. D. Expression of pleiotrophin, an important regulator of cell migration, is inhibited in intestinal epithelial cells by treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Growth factors*; 30: 258-266, 2012.
- Simon-Assmann, P.; Turck, N.; Sidhoum-Jenny, M.; Gradwohl, G.; Kedinger, M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol.* 23: 241–256, 2007.
- Souto, X. M.; Barbosa, H. S.; Menna-Barreto, R. F. The morphological analysis of autophagy in primary skeletal muscle cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* *in press*, abril, 2016.
- Speer, C. A.; Dubey, J. P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology.* 1:35-42. 1998.
- Splendore, A. Un nuovo protozoo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3: 109-112. 1908.
- Spratt, D. E.; Taiakina, V.; Palmer M. Differential binding of calmodulin domains to constitutive and inducible nitric oxide synthase enzymes. *Biochemistry.* 46: 8288-8300, 2007.
- Stempelj, M.; Kedinger, M.; Augenlicht, L.; Klampfer, L. Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. *J Biol Chem.* 13:9797-804. 2007.
- Stuehr, D. J.; Nathan, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med.* 5:1543-55. 1989.
- Su, Y. C. Dual pro-inflammatory and antiviral properties of pulmonary eosinophils in respiratory syncytial virus (RSV) vaccine-enhanced disease. *J. Virol.* 89, 1564–1578, 2015.
- Subauste, C. S. CD40 and the immune response to parasitic infections. "Seminars in immunology." 21: 273-282. Academic Press, 2009.
- Subauste CS.; Wessendarp M. CD40 restrains in vivo growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon. *Infect Immun.* 3:1573-9. 2006.
- Subramani, S.; Malhotra, V. Non-autophagic roles of autophagy related proteins. *EMBO Rep.* 14, 143–151, 2013.
- Suzuki, K.; Oshumi, Y. Molecular Machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs Lett.*, v 581, p 2156-2161, 2007
- Tachado, S. D.; Gerold, P.; McConville, M. J.; Baldwin, T.; Quillici, D.; Schwarz, R. T.; Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties *Proc Natl Acad Sci.* 8:4022-7, 1997.
- Tanida, I.; Tanida-miyake, E.; Komatsu, M.; Ueno, T.; Kominami, E. Human apg3p/aut1p homologue is an authentic e2 enzyme for multiple substrates,

- gate-16, gabarap, and map-1c3, and facilitates the conjugation of hapg12p to hapg5p. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 13739-13744. 2002.
- Takács A.C.; Swierzy I.J.; Lüder C.G. Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. *PLoS One*. 9: 45440.2012.
- Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*;30:1217e58, 2000.
- Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem*. 3:487-502. 1989.
- Torres, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caracterisee par la presence d'un parasite intracellulaire, tres proche du *Toxoplasma l'Encephalitozoon*, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire souscutane et le tissu nerveux. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie* 97, 1778–1781, 1927.
- Trembicki, K. A.; Qureshi, M. A.; Dietert, R. R. Avian peritoneal exudate cells: a comparison of stimulation protocols. *Dev Comp Immunol*. 2:395-402.1984.
- Varelle, M.; Sablet, T.; Hindré, T.; Martin, C.; Gobert, A. P. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10199–10204, 2007.
- Vespa, G. N.; Cunha, F. Q.; Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and immunity* 62.11: 5177-5182, 1994.
- Virgin, H. W.; Levine, B. Autophagy genes in immunity. *Nat. Immunol.*; 10:461–70. 2009.
- Vodovotz, Y.; Russell, D.; Xie, Q. W.; Bogdan, C.; Nathan, C. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J Immunol*. 154:2914-25, 1995.
- Vural, A.; Chong-Shan, S.; Kehrl, J. H. Toll-like Receptors Serve as Activators in macrophages helping to facilitate innate Immunity. CHAPTER-11,2015.
- Weidberg, H.; Shvets, E.; Shpilka, T.; Shimron, F.; Shinder, V.; Elazar, Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Embo J*. 29:1792-802., 2010.
- Weidner, J. M.; Barragan, A. Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 44: 85-90. 2014.
- Yang, J.; Carra, S.; Zhu, W.G.; Kampinga, H. H. The Regulation of the Autophagic Network and Its Implications for Human Disease. *International Journal of Biological Sciences*. 10:1121-1133. 2013.
- Yang, Z.; Klionsky, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*; 335: 1–32, 2009.
- Yang, Z.; Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22:124-31, 2010.
- Yap, G. S.; Pesin. M.; Sher, A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic re-sistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*. 165:1– 4, 2000.
- Yap, G.S.; Sher, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ - and tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med*. 189, 1083–1092, 1999.
- Yorimitsu, T.; Klionsky, D. J. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*, 12: 1542-1552. 2005.

- Zhao, Z.; Fux, B.; Goodwin, M.; Dunay, I. R.; Strong, D.; Miller, B. C.; Cadwell, K.; Delgado, M. A.; Ponpuak, M.; Green, K. G.; Schmidt, R.E.; Mizushima, N.; Deretic, V.; Sibley, L. D.; Virgin, H. W. Autophagosome independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe* 4, 458–469, 2008
- Zhao, Y. O.; Khaminets, A.; Hunn, J. P.; Howard, J. C. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog.* 5, e1000288, 2009.
- Zappavigna, S.; Luce, A.; Vitale, G.; Merola, N.; Facchini, S.; Caraglia M. Autophagic cell death: A new frontier in cancer research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4: 250-262. 2013.