

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Gabriel Rabello de Abreu Cabral

Análise da expressão de Arginase 1 e Óxido Nítrico Sintase induzida relacionadas com a imunidade em macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii*

Campos dos Goytacazes, RJ- Brasil

Março de 2015.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Gabriel Rabello de Abreu Cabral

Análise da expressão de Arginase 1 e Óxido Nítrico Sintase induzida relacionadas com a imunidade em macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii*

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

Orientador: Renato Augusto DaMatta

Campos dos Goytacazes, RJ- Brasil

Março de 2015.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Gabriel Rabello de Abreu Cabral

Análise da expressão de Arginase 1 e Óxido Nítrico Sintase induzida relacionadas com a imunidade em macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii*

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

Aprovada em 27 de março de 2015.

Banca examinadora:

---

Prof. Dra. Andrea Cristina Veto Arnholdt  
Professora Titular- LBR/CBB/UENF

---

Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho  
Professor Titular- LBCT/CBB/UENF

---

Prof. Dra. Suzana Passos Chaves  
Professora Adjunta- UFRJ/Macaé

---

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta  
Orientador – Professor Associado- LBCT/CBB/UENF

“Eu sou a luz do mundo. Aquele que me segue não andará nas trevas, mas terá a luz da vida”. João 8.12

## **Agradecimentos**

- Agradeço a Deus por me dar saúde, força e determinação para alcançar meus objetivos e sonhos.
- Agradeço ao meu pai Osmani Cabral de Matos, a minha mãe Gisela Maria Rabello de Abreu Cabral, a minha irmã Carolina de Fátima Rabello de Abreu Cabral, ao meu avô Evaldo Rios de Abreu e a minha tia Maria Auxiliadora Rabello de Abreu, por todo amor e confiança depositado em mim.
- Agradeço ao Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta, que desde a Iniciação Científica têm sido o mentor da minha formação acadêmica/científica. Sempre de maneira muito presente e paciente tem me guiado ao longo dos anos. Pessoa na qual tenho enorme carinho, admiração e gratidão.
- Agradeço ao colaborador Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende, que desde a Iniciação Científica tem colaborado com o aperfeiçoamento da minha formação acadêmica/científica. Sempre presente e com uma vontade admirável de contribuir com o trabalho, me ensinando a técnica de PCR.
- Agradeço a colaboradora Dr. Josiana Gomes de Andrade pela amizade e dedicação no aperfeiçoamento deste trabalho, que de maneira muito competente me ensinou a técnica de Imunoeletrotransferência.
- Agradeço ao Dr. João Cláudio Damasceno de Sá pela amizade, companheirismo e por todos os ensinamentos ao longo dos anos. Também agradeço pela revisão deste trabalho.
- Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra pela amizade, incentivo e sugestões para o desenvolvimento desta dissertação.
- Agradeço ao Técnico Arthur Rodrigues pela amizade, ajuda e ensinamentos com a técnica de Imunoeletrotransferência.
- Agradeço a Helena Carolina Martins Vargas pela amizade e ajuda com os experimentos de PCR.
- Agradeço as técnicas do LBCT, em especial a Rosemary Maciel, Adriana Martins, Giovana Moraes, Beatriz Ribeiro, Darly Grativol, Márcia Adriana e Luciana Timóteo pelo companheirismo, amizade e ensinamentos.
- Agradeço aos funcionários do Biotério, em especial ao Fábio Conceição, Paulo Sérgio e Maurício de Oliveira por toda ajuda e ensinamentos.

- Agradeço aos amigos e companheiros de trabalho, Ms. Juliana Azevedo, Dr. João Cláudio, Ms. Luciana Lemos, Ms. Fernanda Souza, Ms. Thiago Torres, Julia Resende, Natália Almeida, Ms. Luana Carvalho, Vagner Assis e Viviane Campos pela amizade, companherismo e ensinamentos ao longo de todos esses anos. Meu muito obrigado.
- Agradeço a Letícia Oliveira, Gildeíde Costa e Brunna Xavier pela amizade e carinho.
- Agradeço aos meus amigos, Inácio Pestana, Bruno Pestana, Rodrigo Couto, Lucas Passamani, Ricardo Reis, Bruno Navarro, Nikolas Dias, Kayan Ventury, Matheus Asth, Julia Fardin, Bárbara Coelho, Marta Victor, Laís Pessanha, Anna Hautequestt, Luisa Sorrentino, Lívia Coelho, Vinícius Bragança, Bernardo Mota, Matheus Jorge, Guilherme Guzzo e David Gomes, pela amizade e companherismo ao longo de todos esses anos. São minha segunda família.
- Agradeço ao CNPq, FAPERJ, UENF e CAPES, que disponibilizaram a verba necessária para que os experimentos fossem feitos e pela bolsa de mestrado concedida pela CAPES.

## Sumário

Lista de abreviaturas	IX
Lista de figuras e tabelas	X
Resumo	XIV
Abstract	XV
1. Introdução	1
1.1- Toxoplasmose	1
1.2- <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.3- Sistema Fagocítico Mononuclear	11
1.4- Arginase	21
1.5- Óxido nítrico sintase induzida e Óxido nítrico	25
1.6- Manipulação e evasão dos sistemas microbicidas da célula hospedeira pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	29
2. Justificativa	37
3. Objetivos	37
3.1- Objetivo geral	37
3.2- Objetivos específicos	37
4. Material e Métodos	38
4.1- Obtenção e ativação dos macrófagos	38
4.2- Obtenção de <i>Toxoplasma gondii</i>	38
4.3- Interação parasito-célula hospedeira	39
4.4- Expressão da iNOS, e ARG1 revelada por imunofluorescência e Imunoeletrtransferência	39
4.5- Avaliação de nitrito	40
4.6- Teste estatístico	40
5. Resultados	41
6. Discussão	47
7. Conclusão	51
8. Referências	52

## Lista de abreviaturas

APC: Célula apresentadora de antígeno  
ARG1: Arginase 1  
CCR: Receptor de quimiocina CC  
CSF1: Fator estimulador de colônia 1  
CX3CR: Receptor de quimiocina CX3C  
CCL: Ligante de quimiocina  
DC: Células dendríticas  
DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco's (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial  
ER: Retículo endoplasmático  
GAPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase  
GM-CSF: Fator estimulador de colônia macrófagos-granulócitos  
GRA: Proteínas dos grânulos densos  
IFNGR: Receptor de IFN- $\gamma$   
IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma  
IL: Interleucina  
iNOS: Óxido nítrico sintase induzida  
IRGs: GTPases relacionadas com a imunidade  
ISPF:  $\alpha$ -isonitrosopropiofenol  
I $\kappa$ B: Proteínas inibidoras de NF- $\kappa$ B  
JAK1/2: Janus Quinase 1 e 2  
LPS: Lipopolissacarídeos  
Ly6C: Antígeno de linfócito 6C  
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade  
MIC: Proteínas das micronemas  
MJ: Junção móvel  
MKP-2: MAP-quinase fosfatase -2  
MPS: Sistema Fagocítico Mononuclear  
NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear Kappa Beta  
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal  
NOS: Óxido nítrico sintase  
ODC: Ornitina descarboxilase  
PBS: Tampão Fosfato-Salino (cloreto de sódio tamponado com fosfato de sódio 0,1 M)  
PS: Fosfatidilserina  
PV: Vacúolo parasitóforo  
PVM: Membrana do vacúolo parasitóforo  
RNS: Espécies reativas de nitrogênio  
RONs: Proteínas do pescoço das rôptrias  
ROPs: Proteínas do bulbo  
ROS: Espécies reativas de oxigênio  
STAT: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição  
TgAMA1: Antígeno de membrana apical 1  
TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformante  $\beta$   
TLR4: Receptores do tipo Toll 4  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral

## Lista de figuras e tabelas

	pag
<p><b>Esquema 1:</b> Status global da soroprevalência de <i>Toxoplasma gondii</i>. Países desenvolvidos como EUA e Europa exibem baixos índices de soroprevalência, ao contrário dos países subdesenvolvidos, como África, ou países em desenvolvimento, como o Brasil, que exibem altos índices de soroprevalência para toxoplasmose. Estes dados mostram a relação direta entre o status socioeconômico do país e o índice de soropositividade para <i>T. gondii</i>. Adaptado de Pappas <i>et al.</i> (2009).</p>	2
<p><b>Esquema 2:</b> Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>. Felídeos são os hospedeiros definitivos no qual a fase sexuada de replicação <i>T. gondii</i> ocorre. Seguido da replicação dos merozoítos dentro dos enterócitos do gato, os gametas macho e fêmea são formados dentro da célula hospedeira (1). Quando esses gametas se fundem, há a formação de oocistos diploides que são liberados nas fezes do gato e sofrem meiose no ambiente para produzir oito esporozoítos de progênie haplóides (2). A fase assexuada do ciclo pode ocorrer nos hospedeiros intermediários e definitivos. Nesta fase do ciclo, taquizoítos de rápida multiplicação se disseminam pelo corpo do hospedeiro, infectando praticamente todos os tipos celulares (3). Sobre pressão do sistema imune, esses taquizoítos se convertem em bradizoítos de multiplicação lenta formando os cistos teciduais (4), marcando o início da fase crônica da infecção. A ingestão dos cistos teciduais por onívoros ou carnívoros leva a transmissão para outros hospedeiros intermediários ou para os gatos (5), reiniciando a fase sexuada do ciclo. Adaptado de Hunter &amp; Sibley (2012).</p>	4
<p><b>Esquema 3:</b> Organização estrutural do taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>. O complexo apical (conóide e anel polar apical) define a região posterior do corpo do parasito e está associado com o processo de invasão da célula hospedeira. Micronemas, rôptrias e grânulos densos são as três principais organelas secretoras encontradas neste parasito. Proteínas dos micronemas são liberadas nos momentos iniciais da invasão do hospedeiro, e estão envolvidas no processo de adesão do parasito a membrana celular. Proteínas das rôptrias também são liberadas nos momentos iniciais da infecção e estão envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo e evasão da imunidade inata e adquirida do hospedeiro. Proteínas dos grânulos densos são liberadas durante e após o processo de invasão da célula hospedeira, e estão envolvidas na modificação do vacúolo parasitóforo, a fim de proporcionar um ambiente para sobrevivência e replicação do parasito. O apicoplasto é um tipo de plastídeo, com quatro membranas e um DNA próprio. Também são encontradas organelas comuns a todos os eucariotos, como núcleo, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndria. Adaptado de Baum <i>et al.</i> (2006).</p>	5
<p><b>Esquema 4:</b> Modelos de diferenciação dos precursores de células dendríticas (DC) e macrófagos circulantes a partir de progenitores pluripotentes na medula óssea. (A) progenitor comum de células dendríticas (CDP) e os progenitores de monócitos (MoPs) são os precursores diretos das pré-DC e monócitos (Mono), respectivamente, e compartilham um precursor comum (MDP). (B) MDP é derivado de um precursor comum de DC (CDP) e dá origem a pré-DC e MoPs. (C) O destino dos progenitores multipotentes linfoides (LMPP) é decidido muito cedo durante a</p>	13

<p>hematopoiese. Abreviações: CDP, progenitor comum de células dendríticas; CSF1R, receptor do fator estimulador de colônia 1; DC, célula dendrítica; flt3, tirosina-quinase relacionada a fms; GMP, progenitor de macrófagos e granulócitos; HSC, célula tronco hematopoiética; LMPP, progenitores multipotentes linfoides; MDP, precursor de macrófagos e células dendríticas; Mono, monócitos; MoP, progenitor de monócitos; pré-DC, precursor de célula dendrítica. Adaptado de Jenkins e Hume (2014).</p>	
<p><b>Esquema 5:</b> Múltiplas faces da fagocitose. Em organismos unicelulares, como <i>Dictyostelium</i> spp., a fagocitose é parte do “sistema digestivo” usado para nutrição. Em organismos multicelulares, a fagocitose é utilizada primeiramente durante a embriogênese para a remoção de células mortas e reciclagem de suas moléculas “esculpindo” o embrião em formação. Em adultos, a fagocitose continua a ter papel no remodelamento e renovação de tecidos, além de papel fundamental na imunidade inata e adaptativa. Adaptado de Desjardins <i>et al.</i> (2005).</p>	18
<p><b>Esquema 6:</b> Utilização diferencial de L- arginina por macrófagos “classicamente” e “alternativamente” ativados. Macrófagos alternativamente ativados por citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-13 expressam Arginase, enzima que converte arginina em ornitina e uréia. Macrófagos classicamente ativados por citocinas pró-inflamatórias como IFN-<math>\gamma</math> expressam iNOS, que converte arginina em NO e citrulina. Adaptado de Gordon (2002).</p>	21
<p><b>Esquema 7:</b> Metabolismo de arginina. Arginina é transportada para o meio intracelular pelo transportador de aminoácidos catiônicos (CAT), podendo ser utilizada pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) na síntese de óxido nítrico (NO) ou ser utilizada pela arginase (ARG I/II) na síntese de ornitina e ureia. Ornitina pode ser convertida em poliaminas, pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), espermidina sintase (SPDSYN) e espermina sintase (SPMSYN) ou em aminoácidos como o glutamato e prolina iniciando pela enzima ornitina amino transferase (OAT). A citrulina é convertida em arginina por duas reações sequenciais iniciando com a arginino succinato sintase (ASS1) que converte a citrulina em argininosuccinato e depois a argininosuccinato liase (AL) converte a argininosuccinato em fumarato e arginina. Adaptado de Balaña-Fouce <i>et al.</i> (2012).</p>	24
<p><b>Esquema 8:</b> Estrutura do domínio oxigenase e redutase de NOS. Sítios de ligação para L-arginina (ARG), heme (H), tetraidrobiopterina (BH4), mononucleotídeo de flavina (FMN) e calmodulina (CaM). Os números indicam a posição dos aminoácidos da iNOS em camundongos. Adaptado de Kone <i>et al.</i> (2003).</p>	26
<p><b>Esquema 9:</b> Presença e atividade de ROP5, ROP16 e ROP18 (principais fatores de virulência) nas diferentes cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>. Esses fatores são expressos diferencialmente nos três genótipos de cepas de <i>T. gondii</i>. Adaptado de Kemp <i>et al.</i> (2013).</p>	31
<p><b>Esquema 10:</b> Manipulação da sinalização celular por diferentes cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>. Proteínas das róprias são liberadas durante e após a invasão da célula e ativam de maneira distinta, vias de sinalização do hospedeiro. Cepas tipo I usam ROP 16 para fosforilar e ativar STAT 3 e STAT 6, levando a ativação de genes que regulam a expressão de ARG1. Porém, ROP 16 de cepas tipo II tem efeito negligenciável sobre STAT 3 e STAT 6. Ademais, GRA15 ativa NF-<math>\kappa</math>B, responsável por controlar a expressão de genes envolvidos na produção de</p>	33

citocinas pró-inflamatórias. Adaptado de Murray <i>et al.</i> (2011).	
<p><b>Esquema 11:</b> Papel dos fatores de virulência de <i>Toxoplasma gondii</i> na modulação da resposta imune no hospedeiro. A proteína ROP16 de cepas tipo I e tipo III (ROP16<sub>I/III</sub>) de <i>T. gondii</i> fosforilam STAT3 e STAT 6, resultando numa ativação prolongada desses fatores de transcrição e subsequente regulação positiva de interleucina 4 (IL-4) que antagoniza com indução de IL-12. GRA15, uma proteína dos grânulos densos, ativa o receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), que por sua vez ativa IκB quinase (IκB), que leva a fosforilação e degradação proteossomal do inibidor de NF-κB. Este por sua vez é translocado para o núcleo e regula a produção de IL-12. Outra proteína de <i>T. gondii</i>, ROP18, localiza-se no lado citoplasmático do vacúolo parasitóforo. Tem sido mostrado que ROP18 fosforila GTPases relacionadas com a imunidade, bloqueando seu acúmulo na membrana do vacúolo parasitóforo e protegendo o parasito da degradação. ROP18 também fosforila o fator de transcrição 6β (ATF6β), que está envolvido na resposta à proteínas desenoveladas e também pode ser importante na apresentação de antígenos pelas células dendríticas. Adaptado de Hunter e Sibley (2012).</p>	35
<p><b>Esquema 12:</b> Degradação da óxido nítrico (NO) sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados e infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>. Após infecção dos macrófagos ativados com <i>T. gondii</i>, a iNOS é degradada via proteossomo, levando a inibição da produção de NO pelos macrófagos. Adaptado de Padrão <i>et al.</i> (2014).</p>	36
<p><b>Figura 1:</b> Macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados, infectados ou não com <i>Toxoplasma gondii</i> cepa RH observados por imunofluorescência e DIC. Número de macrófagos positivos para expressão de ARG1 aumentou e iNOS diminuiu com o tempo de infecção. Expressão de iNOS (verde), núcleo (azul) e ARG1 (vermelho). <i>T. gondii</i> (setas-DIC). <b>A, B e C.</b> Macrófagos ativados por 2h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>A</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>B</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>C</b>). <b>D, E e F.</b> Macrófagos ativados por 6h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>D</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>E</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>F</b>). <b>G, H e I.</b> Macrófagos ativados por 12h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>G</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>H</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>I</b>). <b>J, K e L.</b> Macrófagos ativados por 24h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>J</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>K</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>L</b>). <b>M, N e O.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 2h. Baixa expressão de iNOS (<b>M</b>) e alta expressão de ARG1 (<b>N</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>O</b>). <b>P, Q e R.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 6h. Baixa expressão de iNOS (<b>P</b>) e alta expressão de ARG1 (<b>Q</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>R</b>). <b>S, T e U.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 12h. baixa expressão de iNOS (<b>S</b>) e alta expressão de ARG1 (<b>T</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>U</b>). <b>V, X e Z.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 24h. Baixa expressão de iNOS (<b>V</b>) e alta expressão de ARG1 (<b>X</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>Z</b>).</p>	42
<p><b>Figura 2:</b> <i>Toxoplasma gondii</i> cepa RH inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados. *Significativamente diferente (P &lt; 0.05).</p>	43
<p><b>Figura 3:</b> Separação do lisado celular de macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> cepa RH em gel de poliacrilamida.</p>	44
<p><b>Figura 4:</b> Wester blot do lisado de macrófagos ativados e infectados ou não com <i>T. gondii</i> cepa RH nos tempos de 2, 6, 12 e 24h. P.M: peso molecular</p>	45

<p><b>Figura 5:</b> Imunofluorescência de macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados e infectados ou não com <i>T. gondii</i> cepa ME-49. A inibição da expressão proteica de iNOS e a indução de ARG1 por <i>T. gondii</i> ocorre apenas nos momentos iniciais da infecção, pois este não é capaz de persistir em macrófagos classicamente ativados. Expressão de iNOS (verde), núcleo (azul) e ARG1 (vermelho). <i>T. gondii</i> (setas-DIC). <b>A, B e C.</b> Macrófagos ativados por 2h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>A</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>B</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>C</b>). <b>D, E e F.</b> Macrófagos ativados por 6h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>D</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>E</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>F</b>). <b>G, H e I.</b> Macrófagos ativados por 12h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>G</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>H</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>I</b>). <b>J, K e L.</b> Macrófagos ativados por 24h e não infectados. Alta expressão de iNOS (<b>J</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>K</b>) sem <i>T. gondii</i> (<b>L</b>). <b>M, N e O.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 2h. Baixa expressão de iNOS (<b>M</b>) e alta expressão de ARG1 (<b>N</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>O</b>). <b>P, Q e R.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 6h. Alta expressão de iNOS (<b>P</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>Q</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>R</b>). <b>S, T e U.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 12h. Alta expressão de iNOS (<b>S</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>T</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>U</b>). <b>V, X e Z.</b> Macrófagos ativados e infectados com <i>T. gondii</i> por 24h. Alta expressão de iNOS (<b>V</b>) e baixa expressão de ARG1 (<b>X</b>) com <i>T. gondii</i> (<b>Z</b>).</p>	<b>46</b>
<p><b>Figura 6:</b> <i>Toxoplasma gondii</i> cepa ME-49 inibe a produção de óxido nítrico apenas nos momentos iniciais da infecção em macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados. *Significativamente diferente (P &lt; 0.05).</p>	<b>47</b>

## Resumo

Sabe-se que ARG1 modula a produção de NO, pois compete com a iNOS pelo substrato arginina. No entanto, existem poucos estudos sobre a indução de ARG1 em macrófagos infectados com diferentes cepas de *T. gondii*. Assim, investigar a cinética da expressão da iNOS e ARG1 em macrófagos infectados com diferentes cepas de *T. gondii* se torna extremamente importante no entendimento da interação parasito célula hospedeira. Macrófagos peritoneais foram cultivados com *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado com 10% de soro fetal bovino. Cepa RH de *T. gondii* foi mantida na cavidade peritoneal de camundongos suíços e a cepa ME-49 foi mantida em células Vero. Macrófagos foram ativados por 24h com IFN- $\gamma$  e LPS e infectados com *T. gondii*. Células aderidas em lamínulas e sobrenadante foram analisadas após 2, 6, 12, e 24h de infecção. Expressão de iNOS e ARG1 foi avaliada por imunofluorescência, e iNOS também avaliada por imunoeletrtransferência e a produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess. A cepa RH de *T. gondii* induziu a degradação da iNOS em macrófagos peritoneais ativados após 2, 6, 12 e 24h de infecção, e nos mesmos tempos, induziu a expressão de ARG1. No entanto, a cepa ME-49 de *T. gondii* inibiu a expressão de iNOS apenas com 2h de infecção, e não foi capaz de manter a degradação da iNOS e aumento na expressão de ARG1. Os resultados com iNOS foram confirmados através de imunoeletrtransferência e dosagem de nitrito. Assim, estes resultados podem auxiliar no entendimento de como cepas virulentas de *T. gondii*, como cepas RH tipo I persistem em macrófagos ativados.

**Palavras chaves:** *Toxoplasma gondii*, Óxido nítrico sintase induzida, Arginase1.

## **Abstract**

It is known that ARG1 modulates NO production, because compete with iNOS for the substrate arginine. However, there are few studies on induction of ARG1 in macrophages infected with different strains of *T. gondii*. Thus, investigate the kinetics of iNOS and ARG1 expression in macrophages infected with different strains of *T. gondii* becomes extremely important in understanding the relation parasite - host cell. Peritoneal macrophage was cultured with *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* supplemented with 10% of fetal bovine serum. RH strain of *T. gondii* was maintained in the peritoneal cavity of Swiss mice and the ME-49 strain was maintained in Vero cells. Macrophages was activated for 24h with LPS and IFN- $\gamma$ , and infected with *T. gondii*. Cells attached to coverslips and supernatant were analyzed after 2, 6, 12, and 24h of infection. iNOS and ARG1 expression was assayed by immunofluorescence, and iNOS also avaliated by immunoelectrotransfer and NO production determined by the Griess reagent. The RH strain of *T. gondii* induced iNOS degradation in activated peritoneal macrophages after 2, 6, 12, and 24h of infection, and at the same time, induces an increase in ARG1 expression. However, ME-49 strain of *T. gondii* inhibits the iNOS expression only with 2h hours of infection, and is not capable to maintain the iNOS degradation and an increase in ARG1 expression. The iNOS results were confirmed by immunoelectrotransfer and nitrite dosage. Thus, these results may help to understand how virulent strains of *T. gondii*, as type I RH strains, persist in activated macrophages.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Inducible nitric oxide synthase, Arginase1.

## 1. Introdução

### 1.1- Toxoplasmose

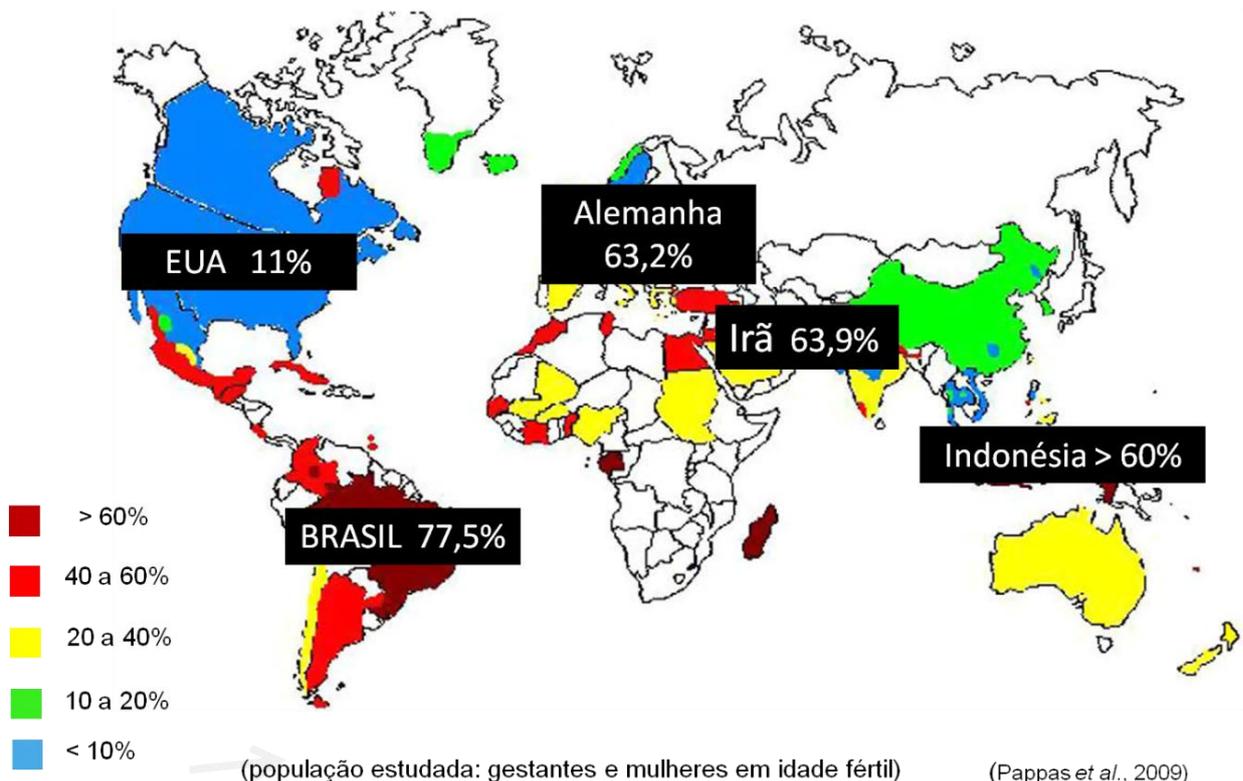
Toxoplasmose é uma zoonose de grande prevalência mundial e tem como agente etiológico o parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Tem-se observado que um terço da população mundial apresenta anticorpos específicos contra *T. gondii*, mostrando a relevância deste parasito (Tenter *et al.*, 2000) e a necessidade de estudos epidemiológicos mais aprofundados para guiar políticas de saúde mais eficientes no combate á doença. Estudos recentes mostram que a situação global de soroprevalência do parasito vem aumentando ao longo dos anos (esquema 1) e este fato está diretamente relacionado com fatores de risco, meio ambiente, hábitos da população de cada país e parâmetros socioeconômicos (Pappas *et al.*, 2009).

Na Europa, de modo geral, há baixa soroprevalência para toxoplasmose, porém, mulheres grávidas ou em idade fértil ainda sofrem alto risco de contrair a doença, pois apenas França, Alemanha e Áustria possuem programas de vigilância para a doença (Benard *et al.*, 2008). Porém, ainda assim, países desenvolvidos e com programas de controle para toxoplasmose, como a Alemanha, podem exibir altos índices da doença devido aos hábitos da população. Em regiões como a Ásia e a Oceania, existe baixa soroprevalência da toxoplasmose, mas observa-se alta prevalência no Oriente Médio incluindo Turquia, Irã, Iraque, Kuwait e baixa prevalência na Arábia Saudita (Al-Qurashi *et al.*, 2001) e Qatar (Abu-Madi *et al.*, 2008). Neste último estudo, os autores ressaltam um ponto interessante, que é a relação entre o número de gatos presentes no Qatar e soroprevalência no país. Atualmente existem cerca de 2 milhões de gatos no Qatar, número elevado em relação a muitos países, e o surpreendente é o fato de países vizinhos exibirem um alto índice de soroprevalência quando comparados com o Qatar (Abu-Madi *et al.*, 2008). Se comparado com os numerosos estudos feitos no inicio de 1990 na África, atualmente existem poucos dados sobre a soroprevalência para toxoplasmose neste continente. Estudos antigos mostram alta soroprevalência em mulheres grávidas ou em idade fértil no Gabão (Nabias *et al.*, 1998), Madagascar (Lelong *et al.*, 1995) e Senegal (Faye *et al.*, 1998). A maioria dos estudos provenientes de países da América latina mostram altas taxas de soropositividade, incluindo

o Brasil, com exceção da capital, Brasília (Cabral *et al.*, 2008). Em Campos dos Goytacazes-RJ, observa-se alta prevalência da doença, o que está diretamente relacionado com o baixo status socioeconômico da maioria da população, sendo a água a principal via de transmissão de *T. gondii* nesta região devido a falta de tratamento (Bahia-Oliveira LM *et al.*, 2003).

Esses dados revelam pontos importantes: falta de políticas de saúde mais eficientes no combate á doença; monitoramento mais eficiente para levantamento de dados mais precisos na distribuição global da toxoplasmose; alta capacidade de adaptação de *T. gondii* as diferentes regiões do mundo.

## Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*



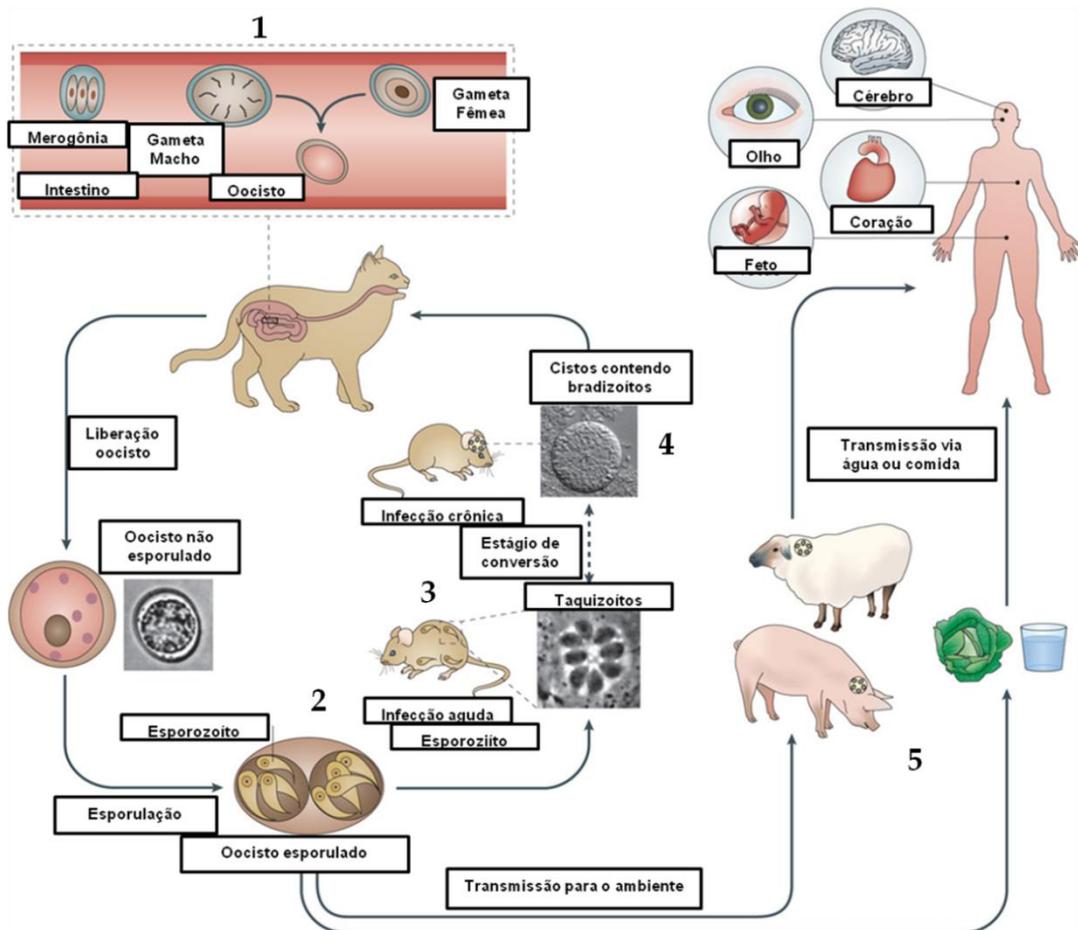
**Esquema 1:** “Status” global da soroprevalência de *Toxoplasma gondii*. Países desenvolvidos como EUA e Europa exibem baixos índices de soroprevalência, ao contrário dos países subdesenvolvidos, como África, ou países em desenvolvimento, como o Brasil, que exibem altos índices de soroprevalência para toxoplasmose. Estes dados mostram a relação direta entre o status socioeconômico do país e o índice de soropositividade para *T. gondii*. As áreas em branco no mapa indicam ausência de estudos estatísticos de prevalência da doença. Adaptado de Pappas *et al.* (2009).

## 1.2- *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é protozoário intracelular obrigatório descoberto em 1908 por Nicolle e Manceaux nos tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi*, na Tunísia (Nicolle e Manceaux, 1908) e por Splendore em coelhos, no Brasil (Splendore, 1908).

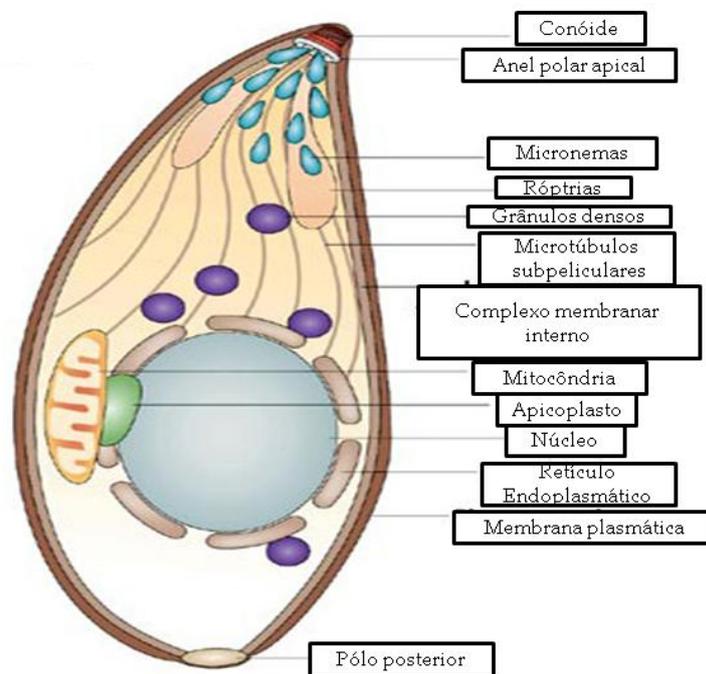
Possui ciclo de vida complexo, consistindo de fase sexuada no hospedeiro definitivo, os felídeos, e fase assexuada nos hospedeiros intermediários, praticamente todos os animais vertebrados de sangue quente, e nos definitivos (Dubey, 2004). Nos hospedeiros, *T. gondii* realiza duas fases assexuadas de desenvolvimento. Na primeira fase, taquizoítos se multiplicam rapidamente por endodigenia em diferentes tipos celulares do hospedeiro. Sobre forte pressão do sistema imune, taquizoítos se convertem em bradizoítos, iniciando a segunda fase do desenvolvimento que resulta na formação dos cistos teciduais. Dentro dos cistos teciduais, bradizoítos multiplicam-se lentamente por endodigenia (Dubey *et al.*, 1998) e possuem alta afinidade pelos tecidos neuronal e muscular, como olhos, músculos esqueléticos e cardíacos. No entanto, podem ser encontrados em menor escala em órgãos viscerais como rim, fígado e pulmão (Dubey *et al.*, 1998). Os cistos teciduais de *T. gondii* no hospedeiro intermediário podem persistir por toda vida. Porém, o mecanismo de persistência ainda não foi completamente elucidado, mas possivelmente esses cistos se rompem liberando bradizoítos que se convertem em taquizoítos que invadem células hospedeiras, crescem, induzem resposta imunológica e novamente se transformam em bradizoítos que formam novos cistos teciduais (Frenkel, 2000). Se ingeridos pelo hospedeiro definitivo, os bradizoítos, nas células epiteliais do intestino delgado, iniciam outra fase assexuada de proliferação que consiste na multiplicação inicial por endodigenia, seguida de repetidas endopoligenias. O fim deste ciclo assexuado de multiplicação marca o início da fase sexuada do ciclo de vida de *T. gondii*. A formação de gamogonia que resulta em oocistos também ocorre no intestino delgado dos felídeos. Oocistos não esporulados são liberados no lúmen intestinal e passam para o ambiente através das fezes. Esporogonia ocorre fora do hospedeiro e leva a formação de oocistos infectivos, com dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítos (Dubey *et al.*, 1998).

Todas as três formas de vida encontradas ao longo do ciclo são infectivas para os hospedeiros intermediários e definitivos e diversas vias podem levar a contaminação de ambos hospedeiros: transmissão horizontal pela ingestão de oocistos infectivos provenientes do ambiente; transmissão horizontal pela ingestão de cistos teciduais em carne mal cozida; transmissão vertical de taquizoítos da mãe para o feto (Evans, 1992) (esquema 2).



**Esquema 2:** Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Felídeos são os hospedeiros definitivos no qual a fase sexual de replicação *T. gondii* ocorre. Seguido da replicação dos merozoítos dentro dos enterócitos do gato, os gametas macho e fêmea são formados dentro da célula hospedeira (1). Quando esses gametas se fundem, há a formação de oocistos diplóides que são liberados nas fezes do gato e sofrem meiose no ambiente para produzir oito esporozoítos de progênie haplóides (2). A fase assexuada do ciclo pode ocorrer nos hospedeiros intermediários e definitivos. Nesta fase do ciclo, taquizoítos de rápida multiplicação se disseminam pelo corpo do hospedeiro, infectando praticamente todos os tipos celulares (3). Sobre pressão do sistema imune, esses taquizoítos se convertem em bradizoítos de multiplicação lenta formando os cistos teciduais (4), marcando o início da fase crônica da infecção. A ingestão dos cistos teciduais por onívoros ou carnívoros leva a transmissão para outros hospedeiros intermediários ou para os gatos (5), reiniciando a fase sexual do ciclo. Adaptado de Hunter & Sibley (2012).

Todos os estágios infectivos exibem uma morfologia básica, com pequenas variações entre eles (esquema 3). *Toxoplasma gondii* consiste de uma estrutura em forma de arco, com aproximadamente 7 µm de comprimento, tendo uma porção anterior mais afinada essencial para o processo de invasão da célula hospedeira, onde são encontradas organelas essenciais para o processo de invasão (Carruthers & Sibley, 1997). Ultraestruturalmente possuem uma intrincada rede de citoesqueleto (Baum *et al.*, 2006), película e rede subpelicular (Lemgruber *et al.*, 2009) e organelas secretoras (Morrissette & Sibley, 2002), todos essenciais na motilidade, reconhecimento, adesão, invasão e evasão da célula hospedeira pelo *T. gondii*.



**Esquema 3:** Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. O complexo apical (conóide e anel polar apical) define a região anterior do corpo do parasito e está associado com o processo de invasão da célula hospedeira. Micronemas, róptrias e grânulos densos são as três principais organelas secretoras encontradas neste parasito. Proteínas dos micronemas são liberadas nos momentos iniciais da invasão do hospedeiro, e estão envolvidas no processo de adesão do parasito a membrana celular. Proteínas das róptrias também são liberadas nos momentos iniciais da infecção e estão envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo e evasão da imunidade inata e adquirida do hospedeiro. Proteínas dos grânulos densos são liberadas durante e após o processo de invasão da célula hospedeira, e estão envolvidas na modificação do vacúolo parasitóforo, a fim de proporcionar um ambiente para sobrevivência e replicação do parasito. O apicoplasto é um tipo de plastídeo, com quatro membranas e um DNA próprio. Também são encontradas organelas comuns a todos os eucariotos, como núcleo, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndria. Adaptado de Baum *et al.* (2006).

A película é uma estrutura trimembranar formada pela membrana plasmática e por um complexo membranar interno que formam todo o complexo (Cintra & De Souza W, 1985). A associação da película com elementos do citoesqueleto fazem que *T. gondii* seja capaz de se locomover e infectar células de maneira ativa, mesmo sem a presença de pseudópodes, flagelos ou qualquer outra estrutura locomotora e ao mesmo tempo, mantenha sua integridade mecânica (Keeley & Soldati, 2004).

Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão de taquizoítos contrastados negativamente e tratados com soluções hipotônicas revelam a intrincada rede de citoesqueleto capaz de conferir integridade e motilidade ao *T. gondii* (Morrissette & Sibley, 2002). Na região apical de *T. gondii*, são encontrados dois anéis apicais localizados logo abaixo da membrana plasmática, o superior com cerca de 160nm de diâmetro e o inferior com 200nm (Morrissette & Sibley, 2002). Logo abaixo destes, encontra-se o anel polar, onde está localizado o centro organizador de microtúbulos, de onde partem microtúbulos subpeliculares, compostos de protofilamentos (De Souza W, 1972) que se estendem da periferia para até dois terços do corpo do parasito (Morrissette *et al.*, 1997). Percorrendo o eixo central do corpo de *T. gondii*, podem ser encontrados dois microtúbulos de 400nm de comprimento que passam por dentro do conóide, estrutura cilíndrica e oca, formada por tubulina em uma conformação espiralada (Hu *et al.*, 2002).

Além dos componentes do citoesqueleto e da rede de membranas, *T. gondii* possui diversas organelas características das células eucarióticas, além de organelas secretórias especializadas como micronemas, róptrias e grânulos densos, que estão envolvidos na penetração ativa, estabelecimento da junção móvel (MJ) e vacúolo parasitóforo (PV), e modulação da célula hospedeira.

O processo de invasão da célula hospedeira se inicia quando *T. gondii* entra em contato com a membrana da célula alvo e realiza o movimento conhecido como “gliding” (Doran, 1982; Fayer, 1972). “Gliding” é o movimento sobre membrana plasmática onde posteriormente, o parasito realiza uma íntima associação e reorienta seu corpo a fim de colocar a parte do complexo apical em contato com a membrana do hospedeiro (Mitchell *et al.*, 2004). Esta motilidade é dependente do sistema de actina e miosina do parasito (Frenal *et al.*, 2010). Após contato com a membrana, há secreção sequencial de

proteínas presentes nas micronemas, róptrias e grânulos densos (Paredes-Santos *et al.*, 2012), que são essenciais na formação da MJ e PV.

Diferente de outros parasitos do Filo Apicomplexa, como *Plasmodium spp* que possui tropismo por hepatócitos e eritrócitos, *T. gondii* é capaz de infectar praticamente todas as células do hospedeiro (Dubey *et al.*, 2003). Essa alta capacidade de infecção sugere que todas as células do hospedeiro possuem um receptor chave para reconhecimento e ligação de *T. gondii* ou que esse parasito não necessita de um receptor específico, sendo capaz de invadir qualquer tipo celular. Estudos mostram que o ácido siálico é um mediador essencial neste processo (Monteiro *et al.*, 1998). Para *T. gondii*, o ligante chave que foi identificado como essencial para ligação ao ácido siálico é a proteína secretada pelos micronemas, TgMIC1 (Blumenschein *et al.*, 2007), e parasitos *knockout* para esta proteína tem sua entrada reduzida em 50% (Cerede *et al.*, 2005).

Micronemas são as primeiras organelas a liberarem seus conteúdos e a liberação das proteínas das micronemas (MIC) são fundamentais para o reconhecimento e forte ligação na membrana do hospedeiro (Friedrich *et al.*, 2010). A secreção do conteúdo das micronemas depende de cascatas de sinalização intracelular que tem como mediador chave o cálcio (Carruthers & Sibley, 1999). A elevação dos níveis de cálcio intracelular ocorre através da liberação de cálcio armazenado no retículo endoplasmático (ER) do parasito, após estímulo de inositol-3-fosfato (Nagamune & Sibley, 2006) e proteínas quinases dependentes de cálcio (Nagamune *et al.*, 2008). Agentes farmacológicos como ionóforo de cálcio e etanol promovem a secreção das MIC (Nagamune *et al.*, 2008), enquanto quelantes de cálcio inibem sua liberação (Carruthers *et al.*, 1999).

A maioria das MIC formam complexos que são pré-montados no ER do parasito até serem transportados para os micronemas, onde diversas MIC foram identificadas: TgMIC2, membro da família das proteínas adesivas que desempenham papel essencial no mecanismo de gliding, ligação e invasão da célula hospedeira (Huynh & Carruthers, 2006); TgMIC6 forma um complexo com outras duas adesinas, TgMIC1 e TgMIC4, fundamentais na invasão *in vitro* e virulência *in vivo* (Blumenschein *et al.*, 2007); TgMIC8 forma um complexo com TgMIC3, essencial para secreção das róptrias e invasão da célula

hospedeira (Kessler *et al.*, 2008). Esses complexos proteicos se reúnem em sua forma funcional para formação da MJ, quando se combinam com o antígeno de membrana apical 1 (TgAMA1) e diversas proteínas do pescoço das róptrias (RONs) como TgRON2, RON4, RON5 e RON8 (Besteiro *et al.*, 2009; Mital *et al.*, 2005).

A MJ é o ponto de contato entre a membrana plasmática da célula hospedeira e de *T. gondii*, que começa no pólo apical e progressivamente se move até a região posterior do parasito (Alexander *et al.*, 2005). Diversas RON e MIC compõem esta estrutura fundamental que ancora o parasito a membrana do hospedeiro, permitindo sua invasão (Alexander *et al.*, 2005; Tyler & Boothroyd, 2011). A caracterização molecular da MJ somente foi obtida recentemente em experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos que ajudaram a identificar o complexo macromolecular que compõe esta estrutura: proteínas RON2, RON4, RON5 e RON8 (Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, 2005; Besteiro *et al.*, 2009; Straub *et al.*, 2009). Estudos recentes mostram que RON5 é uma proteína chave no processo de montagem da MJ, pois a deleção desta proteína resulta na degradação da RON2 e perda do sinal para síntese de RON4 na via secretora de *T. gondii* (Beck *et al.*, 2014). Essas proteínas são secretadas pela região apical de *T. gondii* e colocalizam com a MJ durante a invasão do hospedeiro, formando um anel característico.

Róptrias são organelas alongadas encontradas na região anterior de *T. gondii*, que possuem cerca de 8-12 róptrias, cada uma com cerca de 3 µm de comprimento (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Essas organelas consistem de uma fina região elétron densa, chamada de pescoço da róptria, e uma base chamada de bulbo (Lemgruber *et al.*, 2010). Essas organelas possuem duas classes de proteínas, proteínas RON e proteínas do bulbo (ROP) (Bradley *et al.*, 2005). As RON são as primeiras proteínas a serem secretadas, em resposta à secreção das micronemas (Singh *et al.*, 2010) e muitas delas estão envolvidas na formação da MJ (Proellocks *et al.*, 2010). As ROPs possuem papel fundamental na formação do PV e da membrana do vacúolo parasitóforo (PVM) (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Dentro dessas classes de proteínas são encontradas róptrias com atividade cinase, como as ROP2, ROP18 e ROP16 (Hajj *et al.*, 2006; Hajj *et al.*, 2007; Butcher *et al.*, 2011), róptrias com atividade de fosfatase, como a proteína fosfatase 2C (Gilbert *et al.*, 2007) e

protease, como a TgSUB2 (Miller *et al.*, 2003). Porém, a maioria das proteínas das róptrias parecem ter perdido resíduos catalíticos chave no processo de fosforilação (Carey *et al.*, 2004). Dessas classes de proteínas, 24 estão localizadas no bulbo e 5 no pescoço das róptrias, muitas das quais foram descobertas por análise de róptrias purificadas (Bradley *et al.*, 2005). Além das proteínas, róptrias são compostas de uma porção lipídica rica em colesterol, que podem ser encontradas na porção interna destas organelas quando observadas em microscopia eletrônica de transmissão (Foussard *et al.*, 1991).

As proteínas dos grânulos densos (GRA) são liberadas durante e após o processo de invasão da célula hospedeira, podendo estar associadas com a membrana do vacúolo, rede tubovesicular ou lúmem do PV, desempenhando papel essencial na sobrevivência e replicação do parasito (Mercier *et al.*, 2002). Atualmente estão descritas 14 GRA em taquizoítos de *T. gondii* (Cesbron, 1994; Mercier *et al.*, 2005, Ahn *et al.*, 2005; Rome *et al.*, 2008; Michelin *et al.*, 2009; Masatani *et al.*, 2013; Braun *et al.*, 2013) e todas possuem sequência sinal de 25-30 aminoácidos, exceto GRA3 e GRA6 (Do *et al.*, 1996). A maioria das GRA estão associadas com o sistema membranar do PV, como as GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA6, GRA7, GRA9, GRA12, GRA14 e GRA23 (Sibley *et al.*, 1995; Pszeny *et al.*, 2002; Masatani *et al.*, 2013). GRA1 é uma proteína de 24 kDa que pode ser encontrada tanto em taquizoítos como em bradizoítos de *T. gondii*, sendo secretada no lúmem do PV e subsequentemente se torna associada á periferia da rede membranosa tubular do PV (Sibley *et al.*, 1995). GRA2 foi identificada entre a membrana do parasito e a PVM através de imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão em diferentes estágios da infecção (Dubremetz *et al.*, 1993). GRA2 possui um domínio interno com duas alfa hélices anfipáticas, que podem estar envolvidas na sua associação com a PVM (Sibley *et al.*, 1995). GRA3 é uma proteína de 30kDa exocitada no lúmem do PV após invasão da célula hospedeira pelo *T. gondii* e posteriormente se torna associada com a PVM (Ossorio *et al.*, 1994). GRA4 pode ser encontrada distribuída pelo lúmem do PV, mas posteriormente se associa á rede vacuolar mediada por fortes interações proteína-proteína com GRA6, a fim de formar um complexo multiproteico com a rede intravacuolar (Labruyere *et al.*, 1999). Esta característica levou diversos pesquisadores a produzir vacinas contra GRA4, o que resultou em aumento de 64% na

sobrevida de camundongos C57BL/6 suscetíveis a infecção com *T. gondii* (Desolme *et al.*, 2000). GRA5 é uma proteína secretada tanto no lúmem do PV quanto na PVM durante a invasão da célula hospedeira (Lecordier *et al.*, 1993). Sua porção N-terminal se estende para o citoplasma da célula hospedeira e a região C-terminal para o lúmem do vacúolo (Lecordier *et al.*, 1999). GRA6 é uma proteína de 32 kDa associada com a rede vacuolar do PV (Lecordier *et al.*, 1995). Após ser secretada no PV, GRA6 é translocada para a região posterior de *T. gondii* onde é secretada e se liga a vesículas multi-lamelares (Labruyere *et al.*, 1999). GRA7 é encontrada exclusivamente na membrana de *T. gondii* e da célula hospedeira após invasão, com uma porção de aminoácidos de 181 a 202 como uma possível região de ancoragem (Neudeck *et al.*, 2002). GRA8 é uma proteína de 38kDa liberada durante e após a invasão da célula hospedeira, e possui diversos resíduos de prolina (Carey *et al.*, 2000). GRA9 é uma proteína de 41kDa que se associa com a rede de membrana tubular do PV e como as outras GRAs, é secretada pela região anterior do parasito (Adjogble *et al.*, 2004). GRA10 são as principais proteínas liberadas dos grânulos densos, e são excretadas durante o processo de invasão e se associam com a PVM (Ahn *et al.*, 2005). GRA12 é secretada logo após o processo de invasão da célula hospedeira e se associa com a rede nanotubular membranosa, assim como GRA2 e GRA6 (Michelin *et al.*, 2009). GRA14 é endereçada para a rede intravacuolar e membrana vacuolar que envolve o parasito (Rome *et al.*, 2008). Recentemente, descreveu-se o papel da GRA23 e GRA24 na formação da rede intravacuolar e modulação da resposta imune, respectivamente (Masatani, 2013; Braun, 2013).

Com a secreção das organelas presentes no complexo apical, róptrias, micronemas e grânulos densos, *T. gondii* é capaz de formar o PV, estrutura formada durante o processo de invasão da célula hospedeira (Charron & Sibley, 2004). Uma vez formado, o PV torna-se associado com os filamentos intermediários e microtúbulos da célula hospedeira (Coppens *et al.*, 2006), enquanto a PVM associa-se com a mitocôndria e o retículo endoplasmático (de Souza, 2005). A PVM é uma estrutura que delimita o nicho de multiplicação do parasito (Lingelbach & Joiner 1998). Dentro do PV, *T. gondii* é capaz de acessar nutrientes, manipular as funções celulares do hospedeiro e evadir da resposta imune (Sinai & Joiner 1997; Sibley 2003).

### 1.3- Sistema Fagocítico Mononuclear

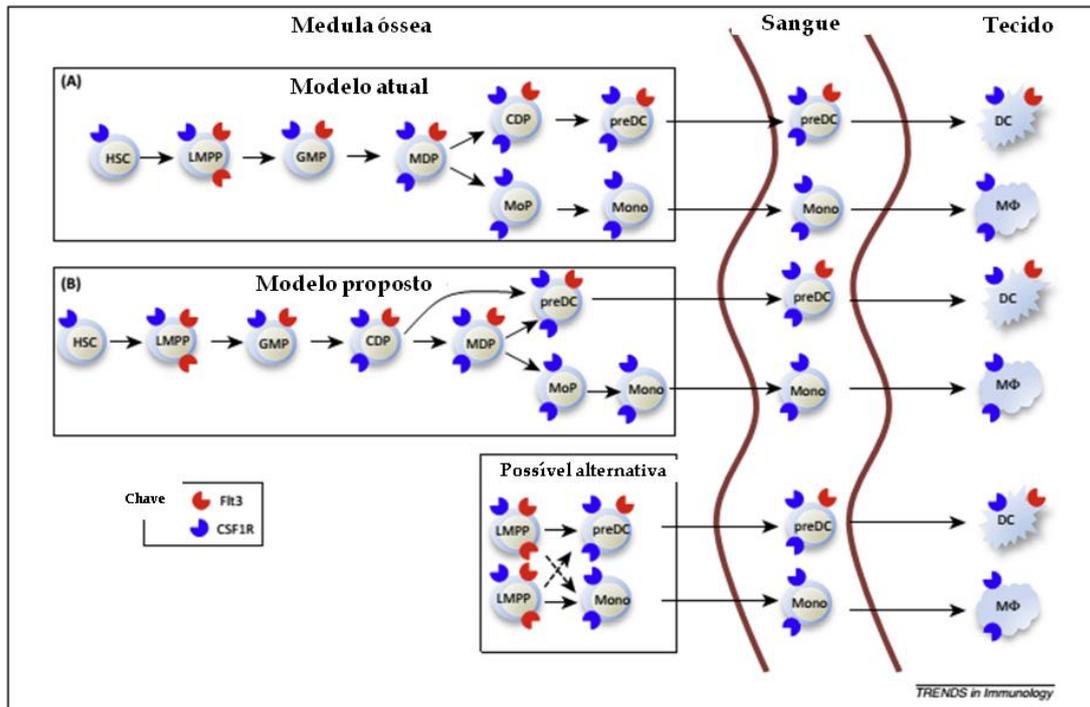
O Sistema Fagocítico Mononuclear (MPS) é composto por uma família de células funcionalmente relacionadas incluindo precursores na medula óssea, monócitos no sangue e macrófagos teciduais (Hume, 2006). Estas células compartilham diversas características, como sua capacidade fagocítica, padrão de expressão gênica e plasticidade (Hume, 2008). A proliferação e diferenciação das células do MPS são dependentes do fator estimulador de colônia 1 (CSF1) e interleucina (IL)-34, agindo através do receptor do fator estimulador de colônia 1 comum (Hume, 2012).

Mudanças no conceito de MPS têm sido propostas por diversos autores devido à identificação de células dendríticas (DC) apresentadoras de antígenos (Dalod *et al.*, 2014) e alta sobreposição de funções e marcadores de expressão entre esses grupos de células (Geissmann, *et al.*, 2010). Quando descobertas, DC eram classificadas como células não fagocíticas ou DC clássicas (Steinman *et al.*, 1980). Com o tempo, a definição de DC clássicas em camundongos tem sido expandida para incluir fagócitos, deste modo, incluindo macrófagos ou qualquer outra célula com capacidade fagocítica e que compartilham marcadores de expressão e funções. Esta definição mostra de maneira implícita que toda célula apresentadora de antígeno (APC) é uma DC por definição. A visão alternativa deste conceito é que macrófagos também podem apresentar antígenos para células T virgens (Hume, 2008). Esta questão continua a ser um assunto polêmico na comunidade científica, e divide opiniões entre pesquisadores (Geissmann, *et al.*, 2010).

Outra mudança proposta no conceito de MPS é a evidência de que os monócitos não são os precursores imediatos de todos os macrófagos teciduais. Todos os tecidos em camundongos possuem grandes populações de macrófagos que expressam F4/80, uma glicoproteína expressa em altos níveis nestas células, e são utilizados como marcadores clássicos na identificação dos macrófagos (Schulz *et al.*, 2012). Pesquisas recentes revelam que muitas das populações de macrófagos teciduais residentes existem independentemente dos monócitos e ainda podem formar uma linhagem embrionária distinta do sistema hematopoiético (Lichanska & Hume, 2000; Ginhoux *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2012). O que intriga os pesquisadores é que parte dos macrófagos não surgem dos monócitos, de onde eles se originam?

Durante o desenvolvimento embrionário, fagócitos são formados no saco vitelino e se dispersam para a circulação, antes da formação das ilhotas hematopoiéticas e da formação definitiva da hematopoiese no fígado (Lichanska & Hume, 2000). Deste modo, acredita-se que macrófagos formados no saco embrionário independentemente das ilhotas hematopoiéticas não passam necessariamente por um estágio de monócito (Lichanska *et al.*, 1999).

Além disso, diversos trabalhos recentes sugerem que as células derivadas do saco vitelino são os progenitores das micróglia, os macrófagos residentes do cérebro (Ginhoux *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2012) e de diversos outros tecidos em adultos (Schulz *et al.*, 2012). Estudos recentes mostram que camundongos geneticamente ou experimentalmente monocitopênicos não possuem deficiência de macrófagos teciduais, sugerindo que estas células possuem capacidade de autorenovação sem um monócito precursor (Vinh *et al.*, 2010; Bigley *et al.*, 2011). Deste modo, o conceito emergente de MPS baseia-se em quatro achados-chaves (esquema 4): 1- células dendríticas apresentadoras de antígenos e com alta sobreposição de marcadores e funções com macrófagos; 2- monócitos não contribuem substancialmente para a maioria dos macrófagos teciduais residentes; 3- macrófagos teciduais em adultos são derivados de precursores do saco vitelino que compartilham os mesmos tecidos antes do nascimento; 4- macrófagos teciduais podem se manter por auto-renovação em adultos.



**Esquema 4:** Modelos de diferenciação dos precursores de células dendríticas (DC) e macrófagos circulantes a partir de progenitores pluripotentes na medula óssea. (A) progenitor comum de células dendríticas (CDP) e os progenitores de monócitos (MoPs) são os precursores diretos das pré-DC e monócitos (Mono), respectivamente, e compartilham um precursor comum (MDP). (B) MDP é derivado de um precursor comum de DC (CDP) e dá origem a pré-DC e MoPs. (C) O destino dos progenitores multipotentes linfoides (LMPP) é decidido muito cedo durante a hematopoiese. Abreviações: CDP, progenitor comum de células dendríticas; CSF1R, receptor do fator estimulador de colônia 1; DC, célula dendrítica; fIt3, tirosina-quinase relacionada a fms; GMP, progenitor de macrófagos e granulócitos; HSC, célula tronco hematopoiética; LMPP, progenitores multipotentes linfoides; MDP, precursor de macrófagos e células dendríticas; Mono, monócitos; MoP, progenitor de monócitos; pré-DC, precursor de célula dendrítica. Adaptado de Jenkins e Hume (2014).

Monócitos são leucócitos presentes em todos os vertebrados, com alguma evidência de uma população celular semelhante em *Drosophila* (Williams, 2007). Localização, fenótipo e morfologia, assim como características genéticas e padrões de expressão gênica definem essas células (Cros *et al.*, 2010; Mildner *et al.*, 2013) que representam de 4% a 10% das células nucleadas no sangue em camundongos e humanos, respectivamente (van Furth & Sluiter, 1986; Swirski *et al.*, 2009).

No sangue periférico de camundongos, monócitos podem ser divididos em dois subgrupos de número relativamente equivalente baseado na expressão do antígeno de linfócito 6C (Ly6C) e receptor de quimiocina CC (CCR) 2 e receptor de quimiocina CX3C (CX3CR)1 (Geissmann *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2009). Essas subpopulações representam uma série de diferenciações controladas por CSF1 com células Ly6C<sup>+</sup> que emergem da

medula óssea através de um mecanismo dependente de CCR2 (Serbina & Pamer, 2006) e subsequentemente se diferenciam em Ly6C<sup>-</sup> (MacDonald *et al.*, 2010; Yona *et al.*, 2013). Monócitos Ly6C<sup>-</sup> foram originalmente descritos como precursores imediatos dos macrófagos residentes (Geissmann *et al.*, 2003), enquanto monócitos Ly6C<sup>+</sup> como células que são recrutadas em condições de inflamação via CCR2 (Auffray *et al.*, 2007) e que são os precursores dos macrófagos teciduais descritos no modelo original de MPS. Monócitos expressam altos níveis de CCR2, que é capaz de reagir com a proteína inflamatória de macrófagos 1  $\alpha$ , uma quimiocina quimiotática para macrófagos (Ancuta *et al.*, 2003). Monócitos Ly6C<sup>+</sup> possuem tempo de meia vida estimado em aproximadamente 18h, se comparados com monócitos Ly6C<sup>-</sup> que possuem tempo de meia vida de 5-7 dias (Yona *et al.*, 2013). A geração da população de monócitos Ly6C<sup>-</sup> é dependente do gene NR4a1 (Carlin *et al.*, 2013), mas a deleção deste gene não altera o número da população de macrófagos teciduais, o que reforça a teoria de que monócitos Ly6C<sup>+</sup> são os precursores dos macrófagos teciduais.

Estudos recentes sugerem que a principal função dos monócitos Ly6C<sup>-</sup> é inspecionar a integridade endotelial (Carlin *et al.*, 2013) e dos monócitos Ly6C<sup>+</sup> de agir no sítio inflamatório e serem os precursores dos fagócitos mononucleares periféricos (Ziegler & Heitbrock, 2013). O recrutamento de monócitos Ly6C<sup>+</sup> ao sítio da inflamação ou injúria fazem destas células um componente chave na resposta imune do hospedeiro a microrganismos invasores, como demonstrado em infecções com *Listeria monocytogenes* (Serbina *et al.*, 2003) e *T. gondii* (Dunay *et al.*, 2008). Camundongos *knockout* para CCR2 ou proteína quimiotática de monócitos falham no recrutamento de monócitos inflamatórios, o que resulta na incapacidade do controle da replicação de *T. gondii* (Dunay *et al.*, 2008). Com o recrutamento destas células para os tecidos inflamados, macrófagos inflamatórios são gerados e uma vez nos tecidos, respondem ao seu microambiente que determina se contribuem para o estabelecimento ou resolução da resposta inflamatória local. Estas atividades opostas provavelmente dependem do recrutamento sequencial de monócitos Ly6C<sup>+</sup> que adquirem diferentes perfis de atividades de acordo com as mudanças que ocorrem no tecido (Arnold *et al.*, 2007). A existência de

outros subgrupos transientes de monócitos murinos tem em termos de fenótipo e função (Ingersoll *et al.*, 2010; Jakubzick *et al.*, 2013).

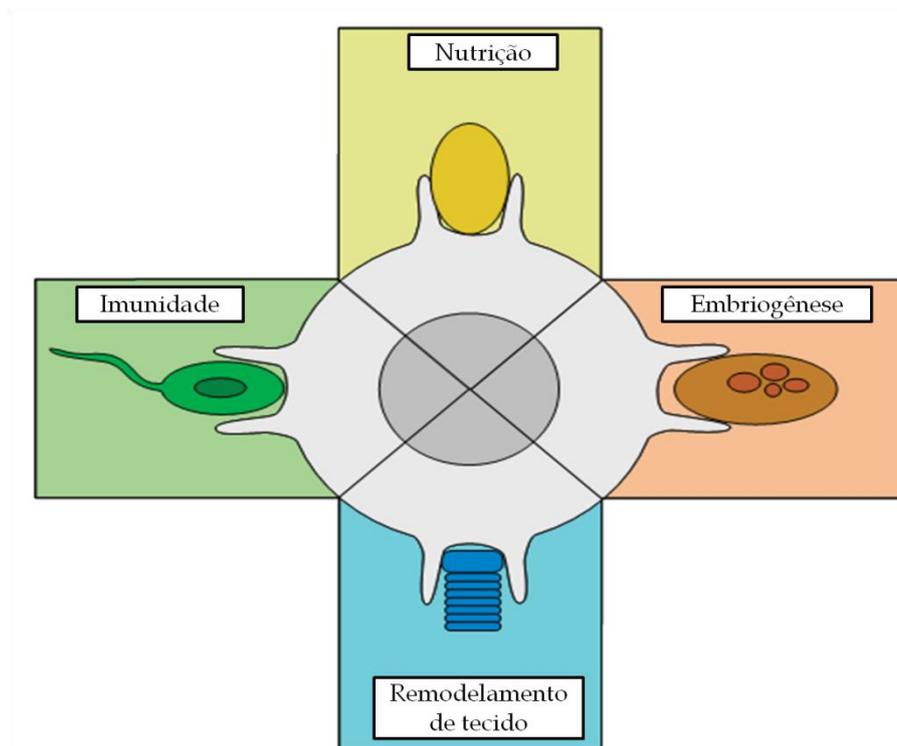
Monócitos inflamatórios Ly6C<sup>+</sup> e monócitos residentes Ly6C<sup>-</sup> geralmente se diferenciam em macrófagos M1 inflamatórios e macrófagos M2 anti-inflamatórios, respectivamente, durante os estágios iniciais da inflamação (Auffray *et al.*, 2007). Monócitos Ly6C<sup>+</sup> exibem atividade fagocítica, proteolítica, inflamatória e digerem tecidos danificados. Por outro lado, monócitos Ly6C<sup>-</sup> recrutados na fase final da inflamação, atenuam as propriedades inflamatórias e se diferenciam em macrófagos M2, contribuindo para angiogênese e deposição de colágeno. Isto mostra a capacidade dos monócitos se diferenciarem em macrófagos regulatórios ou inflamatórios, a fim de promover ou solucionar a inflamação (Auffray *et al.*, 2007). Existe controvérsia sobre a classificação dos macrófagos em M1 e M2, onde muitos autores discordam dessa classificação. Porém, neste trabalho, adotamos a classificação em macrófagos M1 e M2 proposta e defendida por Mills *et al.* (2014).

A presença de subgrupos de monócitos no sangue humano também tem sido descrita, e estes podem se dividir em três subgrupos, como monócitos clássicos CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>, monócitos intermediários CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>, e monócitos não clássicos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> (Ziegler *et al.*, 2010). Estas células se caracterizam pela alta capacidade fagocítica, alta atividade de peroxidase e produzem altos níveis de IL-10 e baixos níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) em resposta a lipopolissacarídeos (LPS) (Cros *et al.*, 2010). O perfil de expressão gênica dos monócitos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> indica que estas células expressam preferencialmente genes envolvidos na angiogênese, cicatrização e coagulação (Wong *et al.*, 2011). Monócitos intermediários CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> caracterizam-se pela atividade inflamatória, com alta produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em resposta a LPS (Cros *et al.*, 2010). Apresentação de antígenos e ativação de células T também tem sido descritos como funções destas células (Wong *et al.*, 2011). Monócitos não clássicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> são responsáveis por patrulhar as paredes dos vasos sanguíneos e migrar para os tecidos através da interação CX3CR1/ligante de quimiocina (CCL) 3. Este subgrupo de monócitos é responsável por liberar IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em resposta a partículas de DNA e RNA (Cros *et al.*, 2010).

Macrófagos são células do MPS e estão entre um dos tipos celulares mais antigos do reino animal (Ottaviani *et al.*, 2012). A maioria dos tecidos do corpo possuem populações de macrófagos residentes, os quais são extremamente heterogêneos e especializados para desenvolver funções tecido-específicas durante o desenvolvimento e toda vida do indivíduo (Gordon & Plüddemann, 2013).

Uma das funções primordiais dos macrófagos residentes é a manutenção da homeostase tecidual, através do monitoramento de microrganismos invasores, respondendo a mudanças fisiológicas do organismo (Geissmann *et al.*, 2010), e absorção de células apoptóticas via digestão após fagocitose (Henson & Hume, 2006; Erwig & Henson, 2008). A fagocitose foi originalmente descrita no final do século XIX por Elie Metchnikoff em larvas de estrela do mar e pode ser definida como o engolfamento de grandes partículas, em um processo dependente do remodelamento de actina e projeção da membrana plasmática em torno da partícula a ser engolfada (Metchnikoff, 1892 *apud* Gordon, 2008). Grande ênfase tem sido dada ao estudo da fagocitose no contexto da imunidade e nas interações parasito-hospedeiro, porém, foi inicialmente descrita como um processo não imune (Gotthardt *et al.*, 2002). *Dictyostelium discoideum* é uma espécie amebóide que vive no solo, pertencente ao filo Mycetozoa e utiliza a fagocitose para obter nutrientes do meio ambiente onde reside, pois a aquisição de hidrolases e o baixo pH contribuem para a formação dos lisossomos, organela onde a degradação de moléculas complexas e a aquisição de nutrientes são favorecidas (Gotthardt *et al.*, 2002). Assim, este processo dinâmico contribui para a formação de um complexo “sistema digestivo” que define sua função primária (Gotthardt *et al.*, 2002). Em organismos multicelulares, a fagocitose se estende sobre a função nutricional para desempenhar papéis-chave na homeostase tecidual, imunidade, remodelamento de tecido e embriogênese (esquema 5) (Desjardins *et al.*, 2005). Os aspectos fundamentais desse processo têm sido investigados em *Caenorhabditis elegans*, um nematóide da família Rhabditidae, que mede cerca de um milímetro de comprimento. A formação dos tecidos em *C. elegans* é acompanhada pelo processo natural de células apoptóticas, que são removidas por fagocitose (Reddien & Horvitz, 2004). Em *C. elegans*, esse processo não é realizado pelos fagócitos profissionais, como os macrófagos,

neutrófilos e DC, mas sim por células vizinhas de diversos tipos (Reddien & Horvitz, 2004). Porém, a função da fagocitose mais bem estudada em mamíferos refere-se ao seu papel na imunidade, ligando a imunidade inata com a adaptativa. APCs são reguladoras críticas da imunidade que continuamente monitoram seu microambiente, capturam e processam antígenos e os apresentam como peptídeos a linfócitos T em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na membrana plasmática (Flannagan *et al.*, 2012). O processamento de antígenos via MHC classe I (MHC-I) é em grande parte voltado para antígenos do citoplasma, núcleo e mitocôndria e ocorre em todos os tipos celulares (Watts, 1997). Porém, processamento de antígenos via MHC classe II (MHC-II), que é limitado a APCs profissionais, são especializadas em apresentar antígenos internalizados do meio extracelular (Watts, 1997). As moléculas de MHC-II são compostas de duas cadeias integrais de membrana,  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas codificadas dentro do MHC (Cresswell, 1996). As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  crescentes no ER facilitam a montagem e saída do MHC-II do ER e a cadeia invariante oclui o sítio de ligação do peptídeo e previne a ligação prematura dos peptídeos (Cresswell, 1996). Ademais, as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  crescentes facilitam o transporte de complexos de MHC-II ao sistema endossomal (McCormick *et al.*, 2005). Os complexos de MHC-II são então apresentados na superfície celular por mecanismos ainda pouco entendidos, onde são capazes de estimular células TCD4+ (Chow *et al.*, 2002). Porém, moléculas do MHC-I são compostas de duas cadeias, uma polimórfica e outra não polimórfica  $\beta$ 2 microglobulina que são montadas no ER (Peaper & Cresswell, 2008). Os peptídeos que se ligam ao MHC-I possuem cadeia de 8-9 aminoácidos, e são gerados no citosol principalmente proteínas mal enoveladas ou retranslocadas do ER clivadas pelo proteossomo ou outras proteases (Yewdell, 2011). Uma vez montado, o complexo MHC-I/ $\beta$ 2/peptídeo é exportado do ER através da via clássica secretora e são expressas na membrana plasmática. A apresentação de antígenos via MHC-I possui papel essencial na imunidade contra células infectadas por vírus e células tumorais através da ação dos linfócitos TCD8+ citotóxicos (Mantegazza *et al.*, 2013).



**Esquema 5:** Múltiplas faces da fagocitose. Em organismos unicelulares, como *Dictyostelium spp.*, a fagocitose é parte do “sistema digestivo” usado para nutrição. Em organismos multicelulares, a fagocitose é utilizada primeiramente durante a embriogênese para a remoção de células mortas e reciclagem de suas moléculas “esculpindo” o embrião em formação. Em adultos, a fagocitose continua a ter papel no remodelamento e renovação de tecidos, além de papel fundamental na imunidade inata e adaptativa. Adaptado de Desjardins *et al.* (2005).

A contribuição dos macrófagos no processo inflamatório talvez seja uma de suas funções mais bem documentadas. Monócitos e macrófagos são capazes de responder a estímulos microbianos e passam a secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-12, CXCL10 e CCL2 (Gordon & Taylor, 2005). Esses fatores são capazes de causar a infiltração e ativação de outros tipos celulares, como linfócitos T, que de maneira orquestrada contribuem para a resposta inflamatória. Deste modo, a identificação de monócitos e macrófagos inflamatórios é um exemplo da polarização destas células em um perfil classicamente ativado (Gordon & Taylor, 2005; Auffray *et al.*, 2007). Em contraste com a função pró-inflamatória, monócitos e macrófagos também podem assumir propriedades imunoregulatórias (Mosser & Edwards, 2008) em um perfil alternativamente ativado, expressando citocinas anti-inflamatórias como fator de crescimento

transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10 que regulam a inflamação (Gustafsson *et al.*, 2008; Serhan *et al.*, 2009).

O conceito de macrófago ativado foi proposto por Mackaness em 1962 no contexto de infecções para descrever a atividade microbicida destas células contra bacillus Calmette-Guerin (BCG) e *Listeria spp.* (Mackaness, 1962). O conceito de “ativação” designa mudanças funcionais e bioquímicas que ocorrem nos macrófagos (Mauel, 1982). Algumas destas mudanças são aumento: no tamanho (Blanden *et al.*, 1969), na síntese proteica (Keller *et al.*, 1974), na síntese e secreção de enzimas lisossomais (Pantalone & Page, 1977), no número de receptores Fc (Arend & Mannik, 1973), na capacidade de matar ou inibir o crescimento de parasitos intracelulares (Mackaness, 1970).

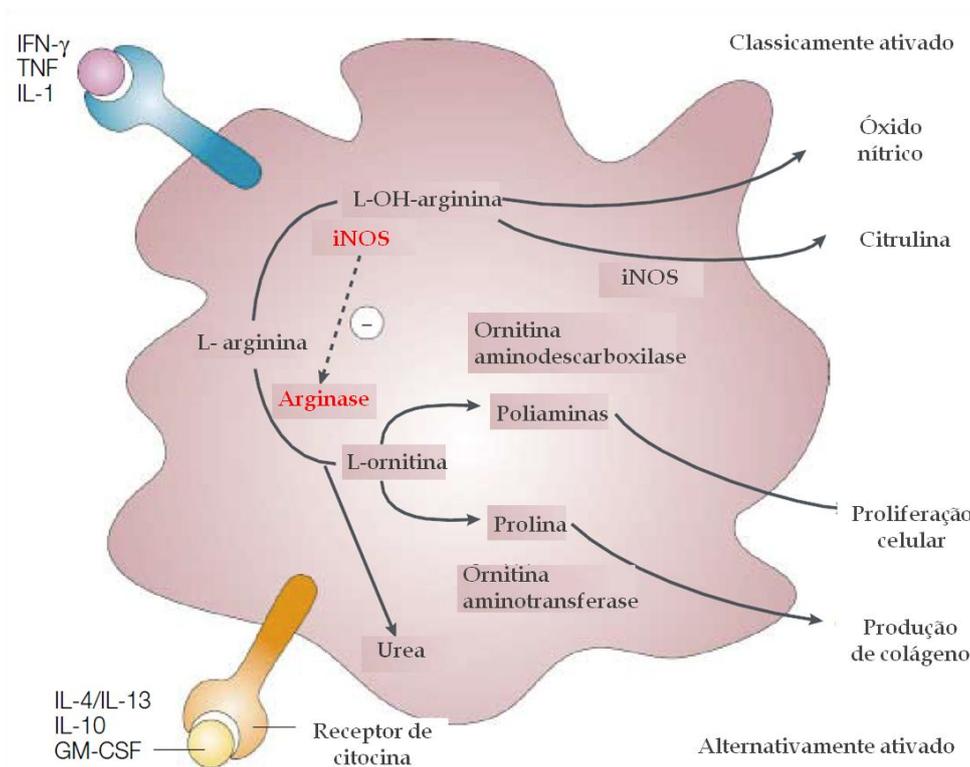
Macrófagos “classicamente” ativados ou “M1” adquirem esse fenótipo em resposta a estímulos por IFN- $\gamma$  e LPS e são caracterizados pela expressão de moléculas de MHCII, produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e quimiocinas como CCL15 e CCL20, quimiotáticas para neutrófilos, monócitos e linfócitos (esquema 6) (Martinez *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2009). Macrófagos M1 são capazes de matar patógenos intracelulares por endocitose de bactérias e vírus, produção de NO via iNOS, síntese de intermediários reativos de oxigênio, pela restrição de ferro e outros nutrientes requeridos para o crescimento bacteriano e replicação viral (Martinez *et al.*, 2008). Os estímulos que induzem o fenótipo de macrófagos M1 são agrupados de acordo com sua habilidade de induzir respostas e marcadores inflamatórios. IFN- $\gamma$  é a principal citocina associada com a ativação clássica dos macrófagos, que é reconhecido pelo receptor de IFN- $\gamma$  (IFNGR). Após ligação, IFNGR recruta Janus kinase 1 e 2 (JAK1/2) que ativa Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (STAT) (Hu & Ivashkiv, 2009) que passa a controlar a expressão gênica de marcadores de ativação celular, moléculas de adesão celular e proteínas envolvidas na resposta imune contra diversos microrganismos, como a iNOS (Nathan & Hibbs, 1991). A expressão da iNOS nos macrófagos induz a produção de intermediários reativos de nitrogênio, como o NO, essencial no controle de *T. gondii* (Adams *et al.*, 1990; Nathan & Hibbs, 1991).

Outro potente ativador de macrófagos no perfil M1 é o LPS, presente na parede celular de bactérias gram negativas, sendo reconhecido por receptores do tipo Toll 4 (TLR4) (Hagar *et al.*, 2013). A ativação de TLR4 pelo LPS induz

forte perfil de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, como as do MHC. A sinalização via LPS é controlada pelo Fator Nuclear Kappa Beta (NF- $\kappa$ B), STAT1 e proteína ativadora 1 (AP-1), muito dos quais participam na sinalização via IFN- $\gamma$  (Hu & Ivashkiv, 2009).

O fator estimulador de colônia macrófagos-granulócitos (GM-CSF) é produzido por diversas células, sendo um dos principais ativadores clássicos de macrófagos (Hamilton *et al.*, 2013). Com a ligação do GM-CSF ao seu receptor, GM-CSF recruta JAK2, induzindo a ativação de STAT5 e NF- $\kappa$ B, onde esses reguladores também fazem parte da sinalização via IFN- $\gamma$  e TLR (Hansen *et al.*, 2008). De modo geral, após ligação destas citocinas aos seus respectivos receptores, os macrófagos assumem um perfil classicamente ativado, sendo o aumento na capacidade microbicida e tumoricida pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e expressão da iNOS, as principais características desse perfil de ativação (Lowenstein & Padalko, 2004; Biswas *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2014).

Macrófagos “alternativamente” ativados ou “M2” foram originalmente chamados de “alternativo”, pois podem ser induzidos por IL-4 ao invés de IFN- $\gamma$  (esquema 6). Monócitos se diferenciam em macrófagos M2 em resposta a IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , LPS ou IL-1 $\beta$  (Martinez *et al.*, 2008). De modo geral, macrófagos M2 se distinguem de outras populações de macrófagos por diversos marcadores incluindo a expressão do receptor de interleucina 4, receptor de manose (MR/CD206) e ARG 1 (Martinez *et al.*, 2009). Macrófagos M2 estão tipicamente associados com respostas Th2 e reparo tecidual por aumentar a fibrose, onde produzem fibronectina, metaloproteínases de matriz e TGF- $\beta$  (Martinez *et al.*, 2009). IL-10 e TGF- $\beta$  liberados pelos macrófagos inibem a resposta Th1 pela ativação de linfócitos T CD4 regulatórios (Bogdan *et al.*, 1992; Sica & Bronte, 2007). Ademais, macrófagos M2 são caracterizados pela alta expressão de ARG 1 em relação a iNOS, fazendo com que essas células sejam altamente eficientes em eliminar infecções por helmintos (Anthony *et al.*, 2007; El Kasmi *et al.*, 2008).



**Esquema 6:** Utilização diferencial de L-arginina por macrófagos “classicamente” e “alternativamente” ativados. Macrófagos alternativamente ativados por citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-13 expressam arginase, enzima que converte arginina em ornitina e uréia. Macrófagos classicamente ativados por citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  expressam iNOS, que converte arginina em NO e citrulina. Adaptado de Gordon (2003).

#### 1.4- Arginase

Arginase (ARG) é uma enzima encontrada em bactérias, leveduras, plantas, invertebrados e vertebrados (Ouzounis & Kyripides, 1994; Dowling *et al.*, 2008). Algumas Arqueobactérias possuem enzima similar, a agmatinase (*Escherichia coli* e *Methanobacterium*) (Dowling *et al.*, 2008). As ARG de plantas são mais similares as agmatinases das arqueobactérias, deste modo, acredita-se que as ARG tenham aparecido nas bactérias pelo recrutamento de diversas agmatinases específicas que então foram transferidas para as células eucarióticas, provavelmente através das mitocôndrias (Sekowska *et al.*, 2000).

ARG é uma metaloenzima manganase binuclear que catalisa a hidrólise de L-arginina para formar L-ornitina e ureia, reação citosólica final do ciclo da ureia (Ash, 2004; Christianson, 2005). Em humanos, defeitos hereditários que comprometem estrutura e catálise da arginase resultam em acúmulo de

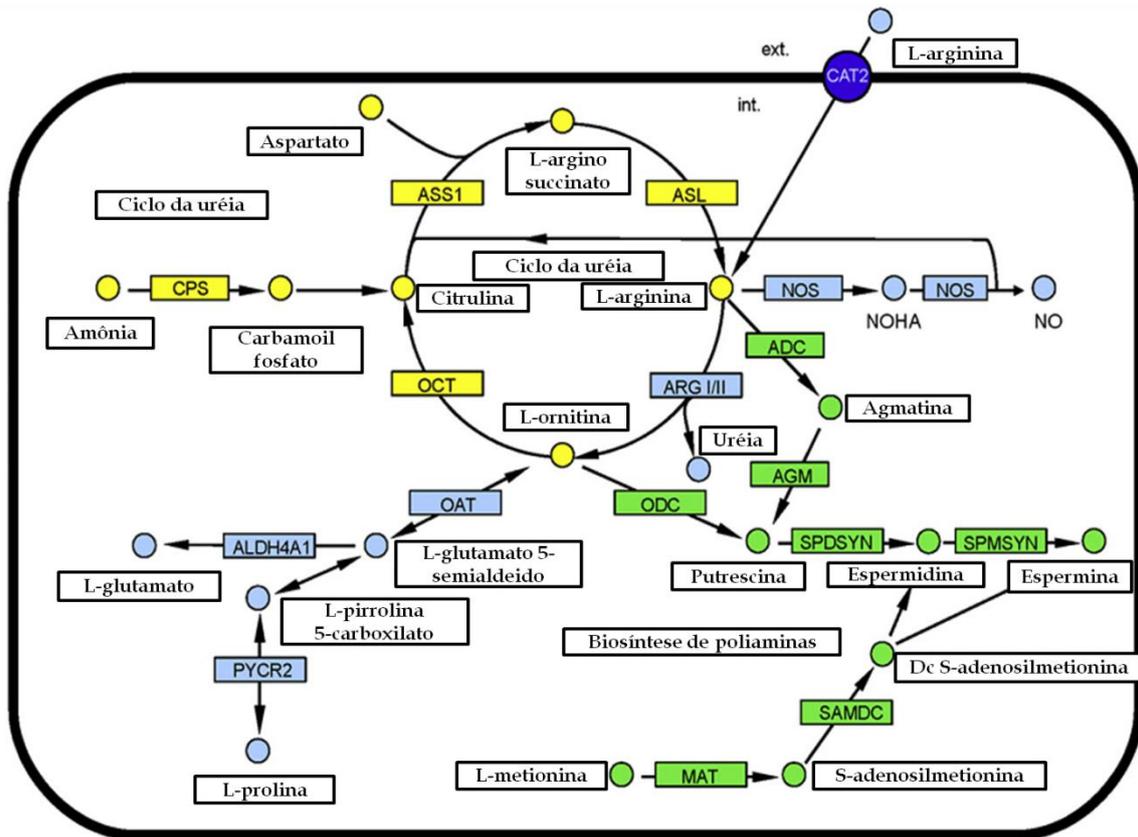
arginina no sangue, conhecido como hiperarginemia (Crombez & Cederbaum, 2005). Esta mesma deficiência também pode causar acúmulo de nitrogênio na forma de amônia, levando a hiperamonemia (Scaglia *et al.*, 2004).

Duas isoformas da enzima foram identificadas e compartilham cerca de 60 % de identidade: arginase I (ARG 1), citosólica no fígado e responsável pelo ciclo da ureia (Herzfeld & Raper, 1976), mas também pode ser encontrada em tecidos não hepáticos (Morris, 2002); Arginase II (ARG 2), enzima mitocondrial, não hepática e responsável pela homeostase de L-arginina (Topal *et al.*, 2006). Além da sua função na homeostase de L-arginina e ciclo da ureia, a atividade de arginase funcionalmente inibe NOS por depletar a L-arginina disponível (Daghigh *et al.*, 1994).

Os primeiros dados da estrutura cristalina de ARG são provenientes da ARG do fígado de rato, que revelam estrutura quaternária na qual cada monômero adota uma conformação  $\alpha/\beta$  com eixo central oito folhas  $\beta$  flanqueadas por diversas alfa hélices (Kanyo *et al.*, 1996). Estudos subsequentes identificaram a estrutura cristalina da ARG 1 (Costanzo *et al.*, 2005) e ARG 2 humana (Cama *et al.*, 2003). Ambas isoenzimas são codificadas por dois genes separados, onde o gene da ARG 1 localiza-se no cromossomo 6q23 e codifica proteína de 322 aminoácidos, enquanto o gene da ARG-2 localiza-se no cromossomo 14q24.1 codificando proteína de 354 aminoácidos (Morris, 2007). O papel fisiológico das diferentes localizações subcelulares de ambas isoformas é desconhecido. Embora ARG 1 e ARG 2 hidrolisem L-arginina para produzir L-ornitina e uréia (Christianson, 2005), a função de ambas pode ser similar ou diferente de acordo com órgãos ou células específicas. Por exemplo, aumento na atividade ou expressão de ARG-1 e ARG-2 em células endoteliais impedem a produção de NO via eNOS (Santhanam *et al.*, 2007). No entanto, em macrófagos, ARG 1 e ARG 2 possuem funções distintas e a expressão de ambas isoformas pode ser induzida de maneira diferencial dependendo do estímulo externo (Khallou-Laschet *et al.*, 2010; Ming *et al.*, 2012). Diversos estudos mostram que ARG-1 é predominantemente expressa em macrófagos M2 e reduz a produção de NO por consumir L-arginina (El Kasmi *et al.*, 2008). Em contraste com ARG 1, apenas pouca e contraditória informação é disponível sobre a expressão e o papel da ARG 2 na regulação dos fenótipos de macrófagos e respostas

inflamatórias. Estudos recentes mostraram que o gene da ARG 2 é alvo do receptor X do fígado e parece exercer efeito na expressão de genes inflamatórios em macrófagos (Marathe *et al.*, 2006). Deste modo, acredita-se que ARG 2 seja anti-inflamatória (El Kasmi *et al.*, 2008).

O metabolismo de arginina é complexo tanto em relação ao organismo (Morris, 2006) quanto à célula (Wu & Morris, 1998), pois diversas enzimas como NOS, ARG, arginina descarboxilase e arginina:glicina amidinotransferase participam do catabolismo deste aminoácido, produzindo metabólitos como NO, ornitina, ureia, citrulina, prolina e poliaminas (Wu & Morris, 1998; Morris, 2006) ou participam da biosíntese de arginina, através das enzimas glutaminase, pirrolina-5 carboxilato sintetase e ornitina aminotransferase (Morris, 2006) (esquema 7). A biosíntese de arginina em mamíferos envolve os aminoácidos glutamina, ornitina e citrulina, onde os passos enzimáticos ocorrem em diferentes tecidos (Wu & Morris, 1998). Glutamina pode ser convertida a ornitina via glutaminase e ornitina aminotransferase e ornitina pode ser convertida a citrulina pela ornitina transcarbamilase (Morris, 2002). Estas reações são parte do ciclo da ureia, no qual a ARG tem papel fundamental junto às outras enzimas do ciclo, as quais são responsáveis pela liberação de citrulina na circulação. Sequencialmente, os túbulos próximos dos rins sequestram a citrulina circulante que é então convertida a arginina nos rins pela argininosuccinato liase e argininosuccinato sintetase, sendo novamente liberada na circulação (Morris, 2002). Além da glutamina, ornitina possui papel central no ciclo da ureia, pois serve como substrato para ornitina descarboxilase (ODC) na síntese de poliaminas (Morris, 2007).



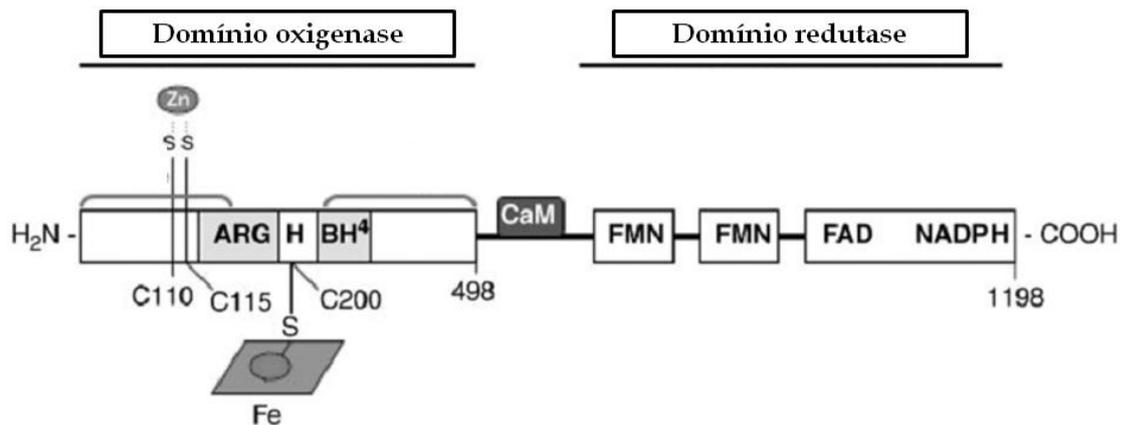
**Esquema 7:** Metabolismo de arginina. Arginina é transportada para o meio intracelular pelo transportador de aminoácidos catiônicos (CAT), podendo ser utilizada pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) na síntese de óxido nítrico (NO) ou ser utilizada pela arginase (ARG I/II) na síntese de ornitina e ureia. Ornitina pode ser convertida em poliaminas, pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), espermidina sintase (SPDSYN) e espermina sintase (SPMSYN) ou em aminoácidos como o glutamato e prolina iniciando pela enzima ornitina amino transferase (OAT). A citrulina é convertida em arginina por duas reações sequenciais iniciando com a argininosuccinato sintase (ASS1) que converte a citrulina em argininosuccinato e depois a argininosuccinato liase (AL) converte a argininosuccinato em fumarato e arginina. Adaptado de Balaña-Fouce *et al.* (2012).

Poliaminas são pequenas moléculas policatiônicas que regulam diversos processos celulares, como a replicação do DNA, tradução de proteínas, crescimento celular e diferenciação (Pegg, 2009). Porém, pouco se sabe sobre o papel das poliaminas nas respostas imunes, por exemplo: espermina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e transporte de arginina em humanos (Zhang *et al.*, 1997) e síntese de NO em ratos (Mossner *et al.*, 2001). Em mamíferos, as únicas poliaminas sintetizadas são putrescina, espermidina, e espermina (Janne *et al.*, 2004). Putrescina é formada pela ação da ODC (esquema 7), sendo considerada fator limitante na produção desta poliamina (Pegg, 2009). A atividade de ODC é regulada na síntese, tradução e estabilidade de mRNA e degradação de proteína (Shantz & Levin, 2007), seu *turnover* é rápido, não requer ubiquitinação e é acelerado pelos altos níveis de

poliaminas. Espermidina e espermina são formadas pela ação enzimática da espermidina sintase e espermina sintase, respectivamente (esquema 7). Apesar da similaridade nas reações, ambas as enzimas possuem estrita especificidade de substrato e a estrutura dos seus sítios ativos são similares diferindo apenas em aminoácidos específicos, garantindo a especificidade da ligação ao substrato (Wu *et al.*, 2008). Apesar dos poucos dados sobre o papel das poliaminas na imunidade (Munder, 2009), inúmeras funções têm sido descritas em estudos com camundongos *knockout* para enzimas chave na síntese de poliaminas (Mossner *et al.*, 2001; Pegg, 2009; Munder, 2009). Devido a sua carga positiva, as poliaminas são capazes de se ligarem a sítios ácidos em macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídeos de membrana, onde todas essas interações possuem algum efeito fisiológico (Pegg, 1988; Childs *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2009). Também tem sido descrito o papel de poliaminas em sinapses nervosas. Canais iônicos receptores de glutamato são capazes de mediar transmissões sinápticas excitatórias no cérebro de mamíferos, controlando o potencial de membrana e homeostase de potássio em muitas células (Lin & Veenstra, 2007; Fleidervish, 2008). Assim, observam-se as inúmeras funções realizadas de maneira direta ou indireta pela ARG ao hidrolisar L-arginina em L-ornitina e ureia, pois estes subprodutos participam e modulam diversas outras vias bioquímicas essenciais para o funcionamento celular (Morris, 2002; Ash, 2004; Munder, 2009).

### **1.5- Óxido nítrico sintase induzida e Óxido nítrico**

Óxido nítrico sintases (NOS) são homodímeros com peso molecular que pode variar de 110 kDa a 160 kDa dependendo da isoforma e compartilham estrutura molecular similar, com um domínio oxigenase N-terminal e um domínio redutase C-terminal (Daff, 2010). O domínio oxigenase contém sítios de ligação para heme e tetraidrobiopterina, enquanto o domínio redutase contém sítios de ligação para cofatores como dinucleotídeo de flavina e adenina, mononucleotídeo de flavina, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Forstermann & Sessa, 2012). O grupo mononucleotídeo de flavina se liga ao domínio oxigenase através do domínio de ligação para calmodulina (Forstermann & Sessa, 2012) (esquema 8).



**Esquema 8:** Estrutura do domínio oxigenase e redutase de NOS. Sítios de ligação para L-arginina (ARG), heme (H), tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), mononucleotídeo de flavina (FMN) e calmodulina (CaM). Os números indicam a posição dos aminoácidos da iNOS em camundongos. Adaptado de Kone *et al.* (2003).

Existem três isoformas da enzima, e cada uma apresenta um conjunto de características e padrões de expressão que são utilizados para definir a sua nomenclatura (Forstermann & Sessa, 2012). Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS1) é expressa nos neurônios e no cérebro e é dependente de cálcio (Huang *et al.*, 2012); Óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2) é assim referida, pois sua expressão pode ser induzida por ativação celular e é independente de cálcio (Forstermann & Sessa, 2012); Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3) é assim referida devido a sua associação com o endotélio e é dependente de cálcio (Forstermann *et al.*, 2006). Essas enzimas são produtos de diferentes genes, com diferente localização, regulação, propriedades catalíticas e apresentam de 51 a 57% de homologia entre as isoformas humanas (Forstermann *et al.*, 2003). Porém, evidências recentes sugerem uma quarta isoforma de NOS presente na membrana interna das mitocôndrias, sendo chamada de NOS mitocondrial (Zaobornyj & Ghafourifar 2012).

Classicamente, duas isoformas de NOS, nNOS e eNOS são comumente associadas a expressão constitutiva (Forstermann & Sessa, 2012). Ambas isoformas são dependentes de cálcio e reguladas através de diversos mecanismos pós-traducionais, incluindo fosforilação e modificação da localização subcelular (Venema, 2000; Musicki *et al.*, 2009). Ademais, nNOS e eNOS estão associados a “baixos” níveis de produção de NO que medeiam sinalização intracelular e homeostase vascular, respectivamente (Forstermann

& Sessa, 2012). Contudo, iNOS é comumente associada a expressão induzida, sendo esta mediada por citocinas pró-inflamatórias ou constituintes microbianos (Lowenstein & Padalko, 2002). Porém, diversos autores tem mostrado que o conceito clássico de constitutivo (nNOS e eNOS) vs. induzido (iNOS) pode mudar em determinadas condições. Forstermann e colaboradores (1998) mostraram que a expressão de eNOS poderia ser induzida por diversos estímulos, que parecem ser espécie-específicos na regulação desta isoforma. Estudos mais recentes identificaram que a expressão da eNOS pode ser induzida em macrófagos de humanos e macacos, porém, a importância da presença e inducibilidade desta isoforma em macrófagos ainda precisa ser elucidada (Mattila *et al.*, 2013). iNOS tem se tornado um paradigma de um gene imunorresponsivo indutível em roedores e a facilidade de sua expressão varia de acordo com as espécies (Gross *et al.*, 2014). Um dos melhores exemplos de expressão constitutiva de iNOS são em epitélio do cólon humano (Lane *et al.*, 2004), pulmão de primata não humano e melanoma (Grimm, *et al.*, 2008). No pulmão, a expressão constitutiva de iNOS é robusta e responsável pela maioria do NO exalado na respiração humana (Lane *et al.*, 2004). Estes resultados mostram que embora a expressão da iNOS seja geralmente induzida, em algumas circunstâncias, pode ser constitutivamente expressa.

NOS é responsável por catalisar a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO em dois passos principais (Daff, 2010). No primeiro passo, NOS hidrolisa L-arginina em N-hidroxi-L-arginina e em seguida, NOS oxida N-hidroxi-L-arginina em L-citrulina e NO (Stuehr *et al.*, 2001).

NO é uma molécula sinalizadora envolvida em funções homeostáticas e imunológicas em diversos sistemas biológicos (Forstermann & Sessa, 2012). Esta molécula difunde-se facilmente, de baixo peso molecular e solúvel em ambientes aquosos e hidrofóbicos, podendo permear livremente pelas membranas biológicas (Thomas *et al.*, 2008). NO foi primeiramente descrito como um fator de relaxamento endotelial, um potente vasodilatador (Miyahara *et al.*, 1994; Nowicki *et al.*, 2007). Posteriormente, descreveu-se sua participação na regulação do tônus vascular, neurotransmissão e inflamação crônica e aguda (Michel & Feron, 1997; Maeda & Akaike, 1998; Di Virgilio, 2004). Porém, o mecanismo de sinalização via NO mais bem conhecido é sua ligação ao grupo heme de guanilil ciclase e subsequente catabolismo de

guanosina trifosfato a guanosina monofosfato, que leva a modulação negativa da atividade da proteína quinase G (Martinez *et al.*, 2011).

O papel crucial de NO como uma molécula microbicida também tem sido alvo de diversos estudos (Nathan & Hibbs, 1991; Hoffman *et al.*, 1997; Hunter & Sibley, 2012). Durante infecções, parasitos expressam antígenos específicos que são reconhecidos pelos macrófagos e induzem nessas células a produção de NO mediada pela expressão da iNOS (Lowenstein & Padalko, 2004). Citocinas induzidas por parasitos, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e produtos microbianos como LPS estimulam a expressão de iNOS na célula infectada, em uma sinalização dependente de NF- $\kappa$ B e STAT1, resultando em produção prolongada de altos níveis de NO (Lowenstein & Padalko, 2004). Em estudos com *Plasmodium spp.*, agente causador da malária, NO é capaz de mediar a morte dos parasitos localizados no fígado do hospedeiro em resposta a IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidos por células T e NK (Hoffman *et al.*, 1997; Jeney *et al.*, 2014). Em modelos de malária aviária, galinhas tratadas com aminoguanidina, inibidor da iNOS, se tornam mais resistentes a infecções com *Plasmodium gallinaceum* devido a redução da anemia, trombocitopenia e inflamação (Macchi *et al.*, 2013). Além da Malária, diversos estudos têm sido conduzidos para contribuir com o entendimento do papel de NO no controle da toxoplasmose, doença causada pelo protozoário *T. gondii* (Hunter & Sibley, 2012). Dependendo do estágio da infecção, NO pode mediar patologia intestinal durante o estágio agudo da infecção ou ser benéfico durante o estágio crônico da infecção no sistema nervoso central (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Em modelos de laboratório, infecções com *T. gondii* são caracterizadas pela alta produção de IL-12 na célula infectada, que por sua vez ativam células T e NK a produzir citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas são potentes ativadores de macrófagos, que passam a expressar iNOS e grandes quantidades de NO (Denkers & Gazzinelli, 1998; Lowenstein & Padalko, 2004). Apesar dos efeitos patológicos nos estágios iniciais da infecção, a produção de NO é essencial na fase crônica da doença. Na ausência de NO, camundongos cronicamente infectados desenvolvem doença letal com grande carga parasitária e severa inflamação cerebral (Khan *et al.*, 1997). Enquanto infecções com protozoários preferencialmente induzem resposta tipo 1 caracterizada pela alta produção de IFN- $\gamma$ , iNOS e NO, infecções por helmintos

tipicamente induzem nas células infectadas um perfil de resposta tipo 2, caracterizada pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Teoricamente, o papel do NO no controle de infecções helmínticas seria mínimo, porém diversos estudos tem mostrado proteção para o hospedeiro (Pearce *et al.*, 1998; Helal *et al.*, 2014). Estudos com helmintos do gênero *Schistosoma*, agente causador da Esquistossomose, tem mostrado que células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados são capazes de produzir NO *in vitro*, após exposição a antígenos e que NO é capaz de regular a formação do granuloma (Oliveira *et al.*, 1999; Helal *et al.*, 2014). Apesar das inúmeras funções de NO em diferentes infecções, um balanço entre ação anti-parasita que resulta na eliminação do agente infeccioso e os efeitos citotóxicos, que resultam em danos teciduais no hospedeiro deve ser atingido para benefício do hospedeiro (Khan *et al.*, 1997). Se a produção de NO é exacerbada, o hospedeiro pode sofrer morbidade. Caso o hospedeiro falhe em produzir quantidades adequadas para eliminar o microrganismo invasor, a carga parasitária pode aumentar e levar a alta mortalidade (Khan *et al.*, 1997).

#### **1.6- Manipulação e evasão dos sistemas microbicidas da célula hospedeira pelo *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa e tem-se observado que um terço da população mundial apresenta anticorpos específicos contra este parasito (Tentar *et al.*, 2000). Diversos estudos mostram que a soroprevalência para *T. gondii* vem aumentando a nível mundial ao longo dos anos (Pappas *et al.*, 2009). Grande parte do sucesso para disseminação de *T. gondii* se deve a facilidade com que é transmitido entre os hospedeiros intermediários (Tentar *et al.*, 2000) e aos mecanismos de invasão e sobrevivência intracelular desenvolvidos e selecionados ao longo do seu processo evolutivo (Lambert & Barragan, 2010). O primeiro mecanismo de evasão descrito para *T. gondii* foi a inibição da fusão dos lisossomos da célula hospedeira com o PV contendo o parasito (Jones & Hirsch, 1972; Sibley *et al.*, 2007). Durante o processo de invasão, *T. gondii* exclui de maneira ativa proteínas do hospedeiro que estão envolvidas na fusão do fagossomo com o lisossomo durante o processo de invasão, evitando assim a destruição do PV pelas enzimas lisossomais (Lingelbach & Joiner, 1998).

Com a evasão da fusão lisossomal e entrada na célula hospedeira, *T. gondii* é capaz de modular ativamente genes da célula hospedeira (Nelson *et al.*, 2008) e conseqüentemente diversas funções celulares (Kemp *et al.*, 2013). Estudos recentes revelam que *T. gondii* é capaz de modular o ciclo celular da célula infectada parando-o na fase G2/M, e das células vizinhas não infectadas, a fim de prepará-las para infecção (Brunet *et al.*, 2008; Molestina *et al.*, 2008). Além da aquisição de nutrientes provenientes do citoplasma da célula hospedeira, a PVM de *T. gondii* interage com as mitocôndrias e retículo endoplasmático a fim de fornecer uma nova fonte de fosfolipídeos, que podem ser utilizados para aumentar o PV durante o processo de divisão do parasito (Sinai & Joiner 2001; Martin *et al.*, 2007). Microtúbulos são essenciais na manutenção da arquitetura celular e movimento das organelas nas células eucarióticas (Brown *et al.*, 2014). A infecção com *T. gondii* induz a reorganização dos filamentos intermediários e microtúbulos em torno do PV, a fim de fortalecer esta organela e posicioná-lo próximo ao núcleo celular (Halonen & Weidner, 1994; Coppens *et al.*, 2006). Para sobreviver e garantir sua multiplicação na célula hospedeira, *T. gondii* obtém diversos nutrientes da célula hospedeira (Charron & Sibley, 2002), além de colesterol (Coppens & Joiner, 2003). Estudos mostram que *T. gondii* utiliza o colesterol da célula hospedeira para invasão e multiplicação além de induzir a liberação do conteúdo das róprias e micronemas (Coppens & Sinai, 2000; Coppens & Joiner, 2003). Ainda na captação lipídica das células hospedeiras, nosso grupo demonstrou que quando macrófagos repletos de corpos lipídicos são infectados com *T. gondii* ocorre associação dessas organelas ricas em lipídeos com o PV que a julga a explicar por que essas células são menos microbidas (Mota *et al.*, 2014).

Estudos utilizando *microarray* de células infectadas mostram genes do hospedeiro que são regulados diferencialmente de acordo com a cepa de *T. gondii* (Saeij *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2011) e este fato está diretamente relacionado com o padrão de expressão gênica de cada cepa do parasito (Melo *et al.*, 2013) (esquema 9).

**Esquema 9:** Presença e atividade de ROP5, ROP16 e ROP18 (principais fatores de virulência) nas diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. Esses fatores são expressos diferencialmente nos três genótipos de cepas de *T. gondii*. Adaptado de Kemp *et al.* (2013).

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
<b>ROP5</b>	+++	+	+
<b>ROP16</b>	++	-	++
<b>ROP18</b>	+++	-	+

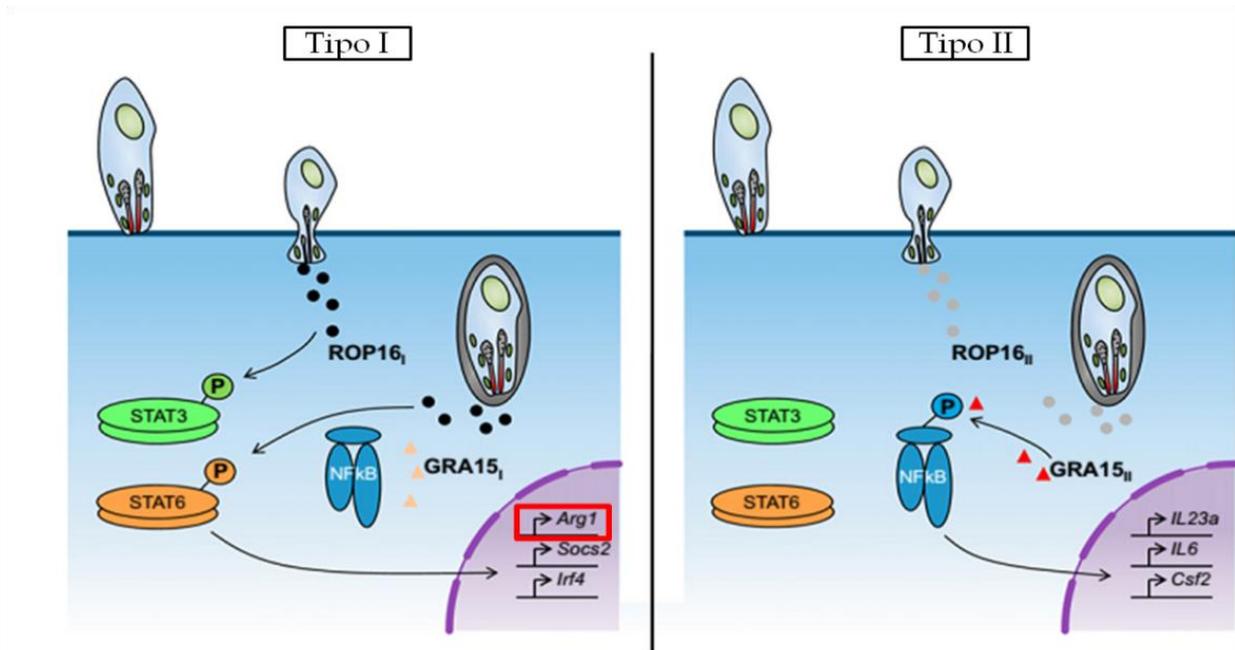
Presença de ROP 5, ROP 16 e ROP 18 nos três principais genótipos das cepas de *T. gondii*. -, inativo; + minimamente ativo; ++, ativo; +++, altamente ativo.

Dentre os diversos genes modulados na célula hospedeira, os que mais têm despertado o interesse dos pesquisadores são aqueles envolvidos na resposta imune (Jensen *et al.*, 2011), incluindo membros da família do NF- $\kappa$ B que levam a ativação das STATs (Saeij *et al.*, 2007). A família do NF- $\kappa$ B compreende 5 membros: p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB e c-Rel (Ghosh & Karin, 2002). Estes fatores de transcrição são essenciais nas respostas imunológicas, pois regulam a expressão de diversos genes que estão envolvidos na produção de citocinas, proliferação e sobrevivência celular, conduzindo a resposta imune inata e adaptativa a infecções (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Em células não estimuladas, NF- $\kappa$ B está ligado a proteínas inibidoras de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) no citoplasma, permanecendo em um estado inativo. A translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo é regulada por mecanismos pós-traducionais de fosforilação das I $\kappa$ B pelas I $\kappa$ B quinases, ubiquitinação e degradação dos I $\kappa$ B no proteossomo (Karin & Ben-Neriah, 2000). A degradação das I $\kappa$ Bs expõe o sinal de localização nuclear do NF- $\kappa$ B levando a sua translocação para o núcleo, com posterior ligação a regiões promotoras dos genes alvo que regulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, onde estas regulam a função das STATs (Silverman & Maniatis, 2001).

Além do NF- $\kappa$ B, STATs também desenvolvem papel central na resposta imune, pois regulam genes envolvidos contra diversos patógenos intracelulares (Quinton & Mizgerd, 2011). STAT é uma família de proteínas classificadas como transdutores de sinais da membrana plasmática para o núcleo, com o propósito de ativar a transcrição de citocinas e fatores de crescimento (Mertens & Darnell, 2007). A fosforilação dos resíduos de tirosina nas proteínas STATs é obrigatória para seu importe nuclear (Heinrich *et al.*, 2003) e sua regulação ocorre através de *feedback* negativo por supressores de sinalização de

citocinas (Butcher *et al.*, 2011). Como estratégia de evasão, *T. gondii* induz supressores de sinalização de citocinas na célula infectada, o que suprime a via de sinalização mediada por IFN- $\gamma$ /STAT1, impedindo a ativação das células no perfil Th1 contra parasitos intracelulares (Zimmermann *et al.*, 2006).

Outra estratégia do parasito é a ativação de STAT3 e STAT6 pela ROP16, porém, esta ativação é dependente da cepa de *T. gondii* (esquema 10) (Butcher *et al.*, 2011). Em parasitos da cepa tipo II ROP16 é inativa e, deste modo, estes parasitos conseguem ativar STAT3 e STAT6 apenas nos momentos iniciais da infecção, mas falham na manutenção do sinal (Saeij *et al.*, 2006; Butcher *et al.*, 2011). Já parasitos da cepa tipo I/III, possuem ROP16 altamente ativas, conseguindo ativar e manter a sinalização via STAT 3 e STAT6 (Butcher *et al.*, 2011). A ativação de ambas as vias pelas cepas tipo I/III desempenham papel essencial na sobrevivência de *T. gondii*, pois, levam a supressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-12 que são essenciais no controle do parasito (Hunter & Remington, 1995) e ao mesmo tempo induzem citocinas anti-inflamatórias que regulam o perfil Th1 contra *T. gondii* (Martinez *et al.*, 2009). Além da modulação do perfil de citocinas expressas nos macrófagos, a ativação das STAT3 e STAT6 induz polarização dos macrófagos em um perfil M2, com alta expressão de ARG1 (Butcher *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2011). ARG1 utiliza L-arginina para síntese de ureia, ornitina e poliaminas para o metabolismo celular (Morris, 1994). L-arginina também é o substrato da iNOS para síntese de NO, essencial no controle de *T. gondii* (Adamas *et al.*, 1990; Yap & Sher, 1999). Ao induzir ARG1 na célula infectada, *T. gondii* modula a produção de NO, pois compete com a iNOS pelo substrato L-arginina e ao mesmo tempo utiliza as poliaminas para seu crescimento, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro a infecção (Butcher *et al.*, 2011; Woods *et al.*, 2013).

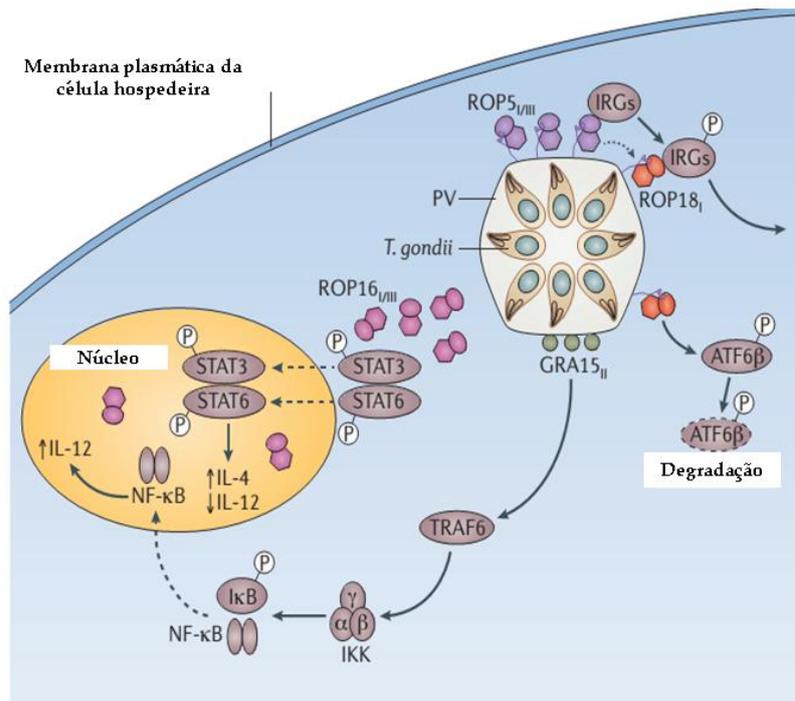


**Esquema 10:** Manipulação da sinalização celular por diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. Proteínas das róptrias são liberadas durante e após a invasão da célula e ativam de maneira distinta, vias de sinalização do hospedeiro. Cepas tipo I usam ROP 16 para fosforilar e ativar STAT 3 e STAT 6, levando a ativação de genes que regulam a expressão de ARG1. Porém, ROP 16 de cepas tipo II tem efeito negligenciável sobre STAT 3 e STAT 6. Ademais, GRA15 ativa NF-κB, responsável por controlar a expressão de genes envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias. Adaptado de Murray *et al.* (2011).

Estudos recentes demonstraram a dupla função da MAP-quinase fosfatase -2 (MKP-2), pois esta enzima é capaz de regular negativamente a expressão da ARG 1 e positivamente a expressão da iNOS em macrófagos (Al-Mutairi *et al.*, 2010). Consequentemente, MKP-2 parece ter um papel essencial na interação *T. gondii* – hospedeiro, pois camundongos C57BL/6 *knockout* para MKP-2 tornam-se mais sensíveis a infecção com cepas tipo II, levando ao aumento na multiplicação do parasito na fase aguda da infecção e aumento da mortalidade dos camundongos após infecção (Woods *et al.*, 2013).

ROP18 e ROP 5 são fatores de virulência secretado pelas róptrias de *T. gondii* que exerce papel fundamental na supressão da imunidade inata mediada pelas IRGs em macrófagos (esquema 11) (Zhao *et al.*, 2009) e são altamente polimórficas entre as diferentes cepas de *T. gondii*; a sequência de aminoácidos das ROP18 em cepas tipo III (ROP18<sub>III</sub>) são 14% divergentes quando comparadas com as ROP18 das cepas tipo I (ROP18<sub>I</sub>) (Taylor *et al.*, 2006) e seu mRNA é expresso 10,000 vezes menos quando comparados com

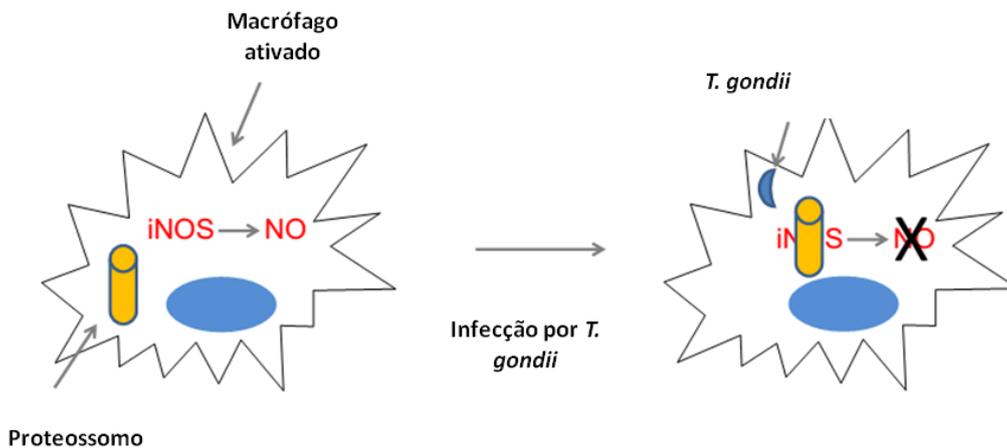
cepas tipo II (ROP18<sub>II</sub>) (Saeij *et al.*, 2006). Além disso, a expressão de uma segunda cópia de ROP18<sub>I</sub> em cepas tipo III resulta em parasitos que são mais virulentos e conseqüentemente mais resistentes em modelo murino quando comparados com a cepa parental selvagem (Taylor *et al.*, 2006). Sendo assim, a atividade quinase das ROP18 é essencial para virulência do parasito e é o principal determinante no processo de supressão das IRGs (Zhao *et al.*, 2009). Poucos minutos após invasão da célula hospedeira pelo *T. gondii*, IRGs se acumulam no PV e se oligomerizam, levando a ruptura da membrana, exposição e eventual morte do parasito (Khaminets *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2009). PV contendo parasito tipo I não acumulam IRGs em sua superfície, pois ROP18<sub>I</sub> fosforilam essas proteínas induzindo sua degradação, enquanto vacúolos contendo parasitos deficientes ou com baixa expressão para ROP18 são alvos dessas proteínas (Fentress *et al.*, 2010; Steinfeldt *et al.*, 2010; Fentress *et al.*, 2012). Estudos mostram que ROP18 interage diretamente com Irga6 e Irgb6, fosforilando essas proteínas, como mostrado em fibroblasto de embrião de camundongos infectados com diferentes cepas de *T. gondii* (Steinfeldt *et al.*, 2010). Os sítios fosforilados nas Irga6 e Irgb6 são essenciais para a oligomerização e estabilidade dessas proteínas, o que impede sua ação (Fentress *et al.*, 2010). Deste modo, a polimorfia encontrada entre as ROP18 das diferentes cepas de *T. gondii* ajudam a explicar as diferenças na virulência das cepas desse parasito, baseado na capacidade de evasão das IRGs (Khaminets *et al.*, 2010).



**Esquema 11:** Papel dos fatores de virulência de *Toxoplasma gondii* na modulação da resposta imune no hospedeiro. A proteína ROP16 de cepas tipo I e tipo III (ROP16<sub>I/III</sub>) de *T. gondii* fosforilam STAT3 e STAT 6, resultando numa ativação prolongada desses fatores de transcrição e subsequente regulação positiva de interleucina 4 (IL-4) que antagoniza com indução de IL-12. GRA15, uma proteína dos grânulos densos, ativa o receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), que por sua vez ativa IκB quinase (IκB), que leva a fosforilação e degradação proteossomal do inibidor de NF-κB. Este por sua vez é translocado para o núcleo e regula a produção de IL-12. Outra proteína de *T. gondii*, ROP18, localiza-se no lado citoplasmático do vacúolo parasitóforo. Tem sido mostrado que ROP18 fosforila GTPases relacionadas com a imunidade, bloqueando seu acúmulo na membrana do vacúolo parasitóforo e protegendo o parasito da degradação. ROP18 também fosforila o fator de transcrição 6β (ATF6β), que está envolvido na resposta à proteínas desenoveladas e também pode ser importante na apresentação de antígenos pelas células dendríticas. Adaptado de Hunter e Sibley (2012).

Com a infecção da célula hospedeira, *T. gondii* modula diversas vias de sinalização do hospedeiro que estão envolvidas na resposta Th1, essencial na infecção contra parasitos intracelulares (Lang *et al.*, 2007). Durante a infecção de macrófagos, *T. gondii* suprime de maneira ativa a produção de IL-12 e TNF-α (Butcher & Denkers, 2002; Belloni *et al.*, 2000; Butcher *et al.*, 2011), ao passo que induz a produção de TGF-β pelos macrófagos via exposição de fosfatidilserina (PS) (Seabra *et al.*, 2004). Células apoptóticas expõem fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que, quando exposto, induz em macrófagos a produção do TGF-β, um potente desativador que age de maneira autócrina e parácrina (Ashcroft, 1999). Estudos mostram que *T. gondii* possui

duas populações, uma população que expõe PS em sua membrana (população PS+) e uma população que não expõe PS (população PS-) (Santos *et al.*, 2011). Com a exposição de PS em sua membrana, *T. gondii* mimetiza uma célula apoptótica e é capaz de invadir os macrófagos de maneira ativa, burlando o sistema microbicida destas células (Santos *et al.*, 2011) o que leva a inibição parcial da produção de NO, pois a iNOS é degradada (Seabra *et al.*, 2004; Guillermo & DaMatta 2004) via proteossomo (esquema 12) (Padrão *et al.*, 2014). Outras possíveis vias de degradação da iNOS também foram investigadas, como a via dos lisossomos e da calpaína, porém, nenhuma delas mostrou estar envolvida na degradação desta enzima em macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* (Padrão *et al.*, 2014). Deste modo, a exposição de PS mostra-se essencial no processo de evasão de macrófagos, pois sem a exposição deste fosfolípídeo, *T. gondii* não é capaz de mediar o mimetismo apoptótico e é então degradado por fagocitose (Santos *et al.*, 2011).



**Esquema 12:** Degradação da óxido nítrico (NO) sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii*. Após infecção dos macrófagos ativados com *T. gondii*, a iNOS é degradada via proteossomo, levando a inibição da produção de NO pelos macrófagos. Adaptado de Padrão *et al.* (2014).

## **2. Justificativa**

Ao longo da evolução, *T. gondii* desenvolveu diversos mecanismos de evasão como a inibição da produção de NO em macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002), e indução da ARG1 na célula infectada (Murray, 2011). Estudos do grupo mostram que *T. gondii* da cepa tipo I (RH) é capaz de inibir a produção de NO em macrófagos ativados, pois induzem a degradação da iNOS via proteossomo (Padrão *et al.*, 2014). Trabalhos recentes também mostram a importância dos fatores de virulência do parasito como ROP 5 e ROP18 (Fentress & Sibley, 2011) na inibição da atividade imune mediada pelas IRGs, pois fosforilam regiões chave para o mecanismo de ação destas proteínas. Ademais, estudos recentes mostram o papel do fator de virulência ROP16 de *T. gondii* na indução de ARG1 em macrófagos (Butcher *et al.*, 2011). Ao induzir ARG1 na célula infectada, *T. gondii* modula de maneira indireta a produção de NO, pois ARG 1 compete com a iNOS pelo substrato arginina, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro a infecção. No entanto, como a infecção por *T. gondii* induz degradação da iNOS, é possível que a modulação positiva da ARG 1 não seja relevante no mecanismo de evasão que envolve o controle da produção de NO. Deste modo, os estudos dos mecanismos de evasão de *T. gondii* são de extrema importância para se entender a relação parasito-célula hospedeira bem como o desenvolvimento de novas estratégias contra esse parasito.

## **3. Objetivos**

### **3.1- Objetivo Geral**

Investigar se iNOS e ARG1 são moduladas por diferentes cepas de *T. gondii* após invasão de macrófagos peritoneais ativados.

### **3.2- Objetivos Específicos**

- Avaliar a expressão de iNOS e ARG1 em macrófagos ativados e infectados com *T. gondii*.
- Realizar dosagem de NO presente no sobrenadante da cultura e a atividade de ARG 1 de macrófagos peritoneais ativados e infectados com *T. gondii*.
- Avaliar os níveis de mRNA para iNOS e ARG1 em macrófagos peritoneais ativados e infectados com *T. gondii*.

#### 4. Material e Métodos

**4.1- Obtenção e ativação dos macrófagos.** Macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos Suíços com 10 ml de solução de Hank's. As células foram centrifugadas a 500xg, 4°C por 10 min, ressuspensas em 4ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM – Sigma, D1152) gelado e 150µl plaqueadas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após 1 h de aderência a 37°C, as células foram lavadas com solução de Hank's e ativadas com IFN-γ (100U/mL) e LPS (0,1 µg/mL) e cultivadas com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, 12657-029) a 37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos de imunoeletrotransferência, macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos Suíços com 10 ml de solução Hank's. As células foram centrifugadas a 500xg, 4°C por 10 min, ressuspensas em 8 ml de DMEM gelado e 1 ml plaqueadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 9 ml de DMEM sem soro gelado. Após 1 h de aderência a 37°C, as células foram lavadas com solução de Hank's e ativadas com IFN-γ (100U/mL) e LPS (0,1 µg/mL) e cultivadas com DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UENF: protocolo numero 98.

**4.2- Obtenção de *Toxoplasma gondii*.** *Toxoplasma gondii*, cepa RH, foi mantido por passagens de 2-3 dias na cavidade peritoneal de camundongos suíços. A lavagem peritoneal foi realizada com solução de Hank's e a suspensão foi centrifugada a 500xg, 4°C por 10 min, e o sobrenadante novamente centrifugado a 1000xg, 4°C por 10 min para concentrar os taquizoítos. Os parasitos foram ressuspensos em 1ml de DMEM e contados na câmara de Neubauer. Já a cepa ME-49, foi mantida na forma de cistos teciduais por passagens em camundongo. Taquizoítos desta cepa foram obtidos com a inoculação peritoneal dos cistos em camundongos, posterior lavagem peritoneal após 5-7 dias e manutenção de taquizoítos em células Vero *in vitro* (Hofflin *et al.*, 1987). Posteriormente, as células Vero infectadas foram raspadas, centrifugadas a 1000xg, 4°C por 10 min, ressuspensas em DMEM e contadas na câmara de Neubauer. Células Vero foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, a 37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

- 4.3- Interação parasito-célula hospedeira.** Após 24 h de ativação, os macrófagos foram lavados com solução de Hank's, infectados com *T. gondii* cepas RH ou ME-49 por 2h na proporção de 10:1 parasitos por macrófagos, lavados com solução de Hank's e mantidos a 37° C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2, 6, 12 e 24 h em DMEM.
- 4.4- Expressão da iNOS, e ARG1 revelada por imunofluorescência e Imunoeletrotransferência.** As lamínulas com células aderidas foram coletadas e fixadas por 30 min com 3% de formaldeído recém preparado em tampão fosfato salino (PBS), lavadas 3 vezes com PBS, permeabilizadas com 0,5 % de Triton x-100 em PBS, incubadas por 30 min em 50mM de NH<sub>4</sub>Cl em PBS e 10 min em PBS contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA-PBS). Para os experimentos de imunolocalização de iNOS e ARG 1, as células foram incubadas por 1 h com anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS (Santa Cruz, sc-8310) diluído 1:200 em PBS-BSA e anticorpo monoclonal de camundongo anti-ARG1 (R&D Systems MAB5868) diluído 1:100 em PBS-BSA. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com PBS-BSA; incubadas por 1 h com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com Alexa 488 (invitrogen), para revelar iNOS, diluído 1:100 em PBS-BSA e anti-IgG de camundongo conjugado com TRITC (sigma), para revelar ARG 1, diluído 1:400 em PBS-BSA. Taquizoítos foram visualizados através da técnica de contraste interferencial de Nomarski (DIC). As células foram lavadas 8 vezes com PBS, montadas em Prolongold com DAPI (Molecular Probes) e as imagens capturadas com câmera AxioCam Mrc5 no sistema Axiovision da Zeiss, com tempo de exposição devidamente padronizado.

Após 24 h de ativação, os macrófagos foram lavados com solução de Hank's, infectados com *T. gondii* cepas RH ou ME-49 na proporção de 10:1 parasitos por macrófagos e mantidos a 37° C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2, 6, 12 e 24 h de infecção, as células foram lisadas com 100µl da solução de Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, e 50µl do coquetel de inibidor de proteases (Sigma, P8340). O lisado foi coletado em *Eppendorfs*, congelados e descongelados duas vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 14.000xg por 10min. O sobrenadante foi congelado para dosagem de proteínas. Como controle positivo para expressão de iNOS e arginase, foram utilizados macrófagos ativados com IFN-γ e fígado lisado de camundongos suíços,

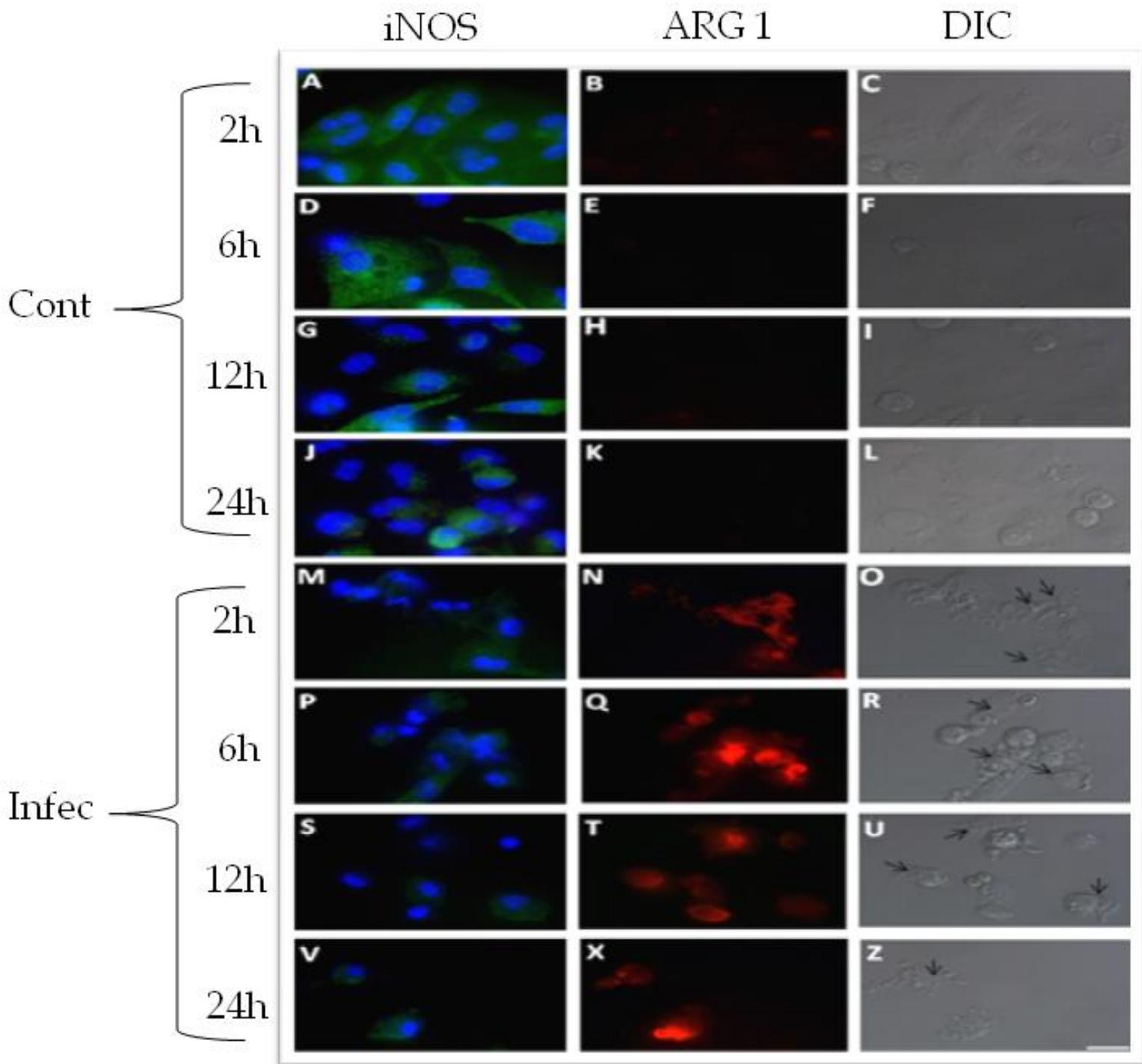
respectivamente. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976). As proteínas do lisado celular foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Um gel não corado contendo as proteínas separadas foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi lavada com tampão PBS-tween (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6, tween-20 0,05%). A membrana foi bloqueada com 2% de leite desnatado em PBS-tween por 2h em agitação ou *overnight*. Posteriormente, a membrana foi lavada cinco vezes com tampão PBS-tween e incubada com anticorpo primário (anti-iNOS, anti-ubiquitina e anti-ARG) todas diluído 1:1000 em tampão bloqueador) por 2h sob agitação, e então lavada novamente cinco vezes com PBS-tween e incubada com anticorpo secundário (anti IgG de coelho complexado a peroxidase) por 2h sob agitação. A membrana foi lavada com PBS-tween novamente por cinco vezes. Posteriormente a membrana foi revelada usando diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**4.5- Avaliação de nitrito.** A produção de NO foi avaliada indiretamente medindo-se o nitrito nos sobrenadantes coletados com 2, 6, 12 e 24h após a interação com *T. gondii* (Griess *et al.*, 1982). 50µl do sobrenadante de cada poço foi colocado com um mesmo volume do reagente de Griess (1:1, de 0,1% N-1-nafeti-etilanadiazina, Sigma – N-5889, em água destilada e 1% de sulfanilamida, Sigma – S-9251 em 5% de ácido fosfórico, Sigma – P5811) na placa de 96 poços. A absorbância de 540 nm foi avaliada em um leitor de microplaca Versamax. A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão pré-calibrada usando nitrito de sódio diluído em DMEM como padrão.

**4.6- Teste estatístico.** Foi realizado teste estatístico ANOVA para observar a significância dos resultados utilizando  $P < 0,05$ .

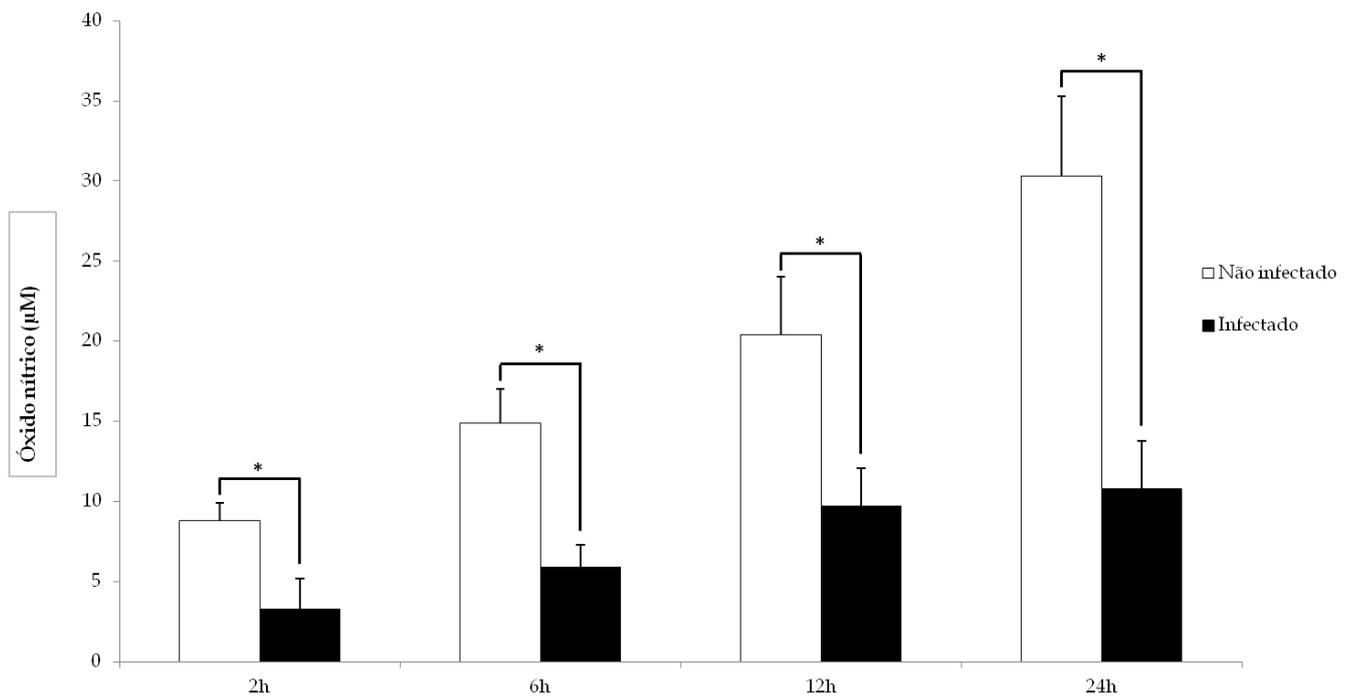
## 5 - Resultados

Macrófagos classicamente ativados foram infectados com *T. gondii* da cepa virulenta tipo I (RH) por 2, 6, 12 e 24 h e tiveram a expressão de iNOS e ARG 1 avaliada através de imunofluorescência (Figura 1). Macrófagos classicamente ativados e não infectados (controle) apresentaram alta expressão de iNOS (verde) e baixa ou nenhuma expressão de ARG 1 (vermelho) (figura 1 A a L). Porém, macrófagos classicamente ativados e infectados com *T. gondii* (Figura 1 M a Z) apresentaram expressão de ARG1 e baixa expressão de iNOS. Parasitos foram visualizados através de DIC.



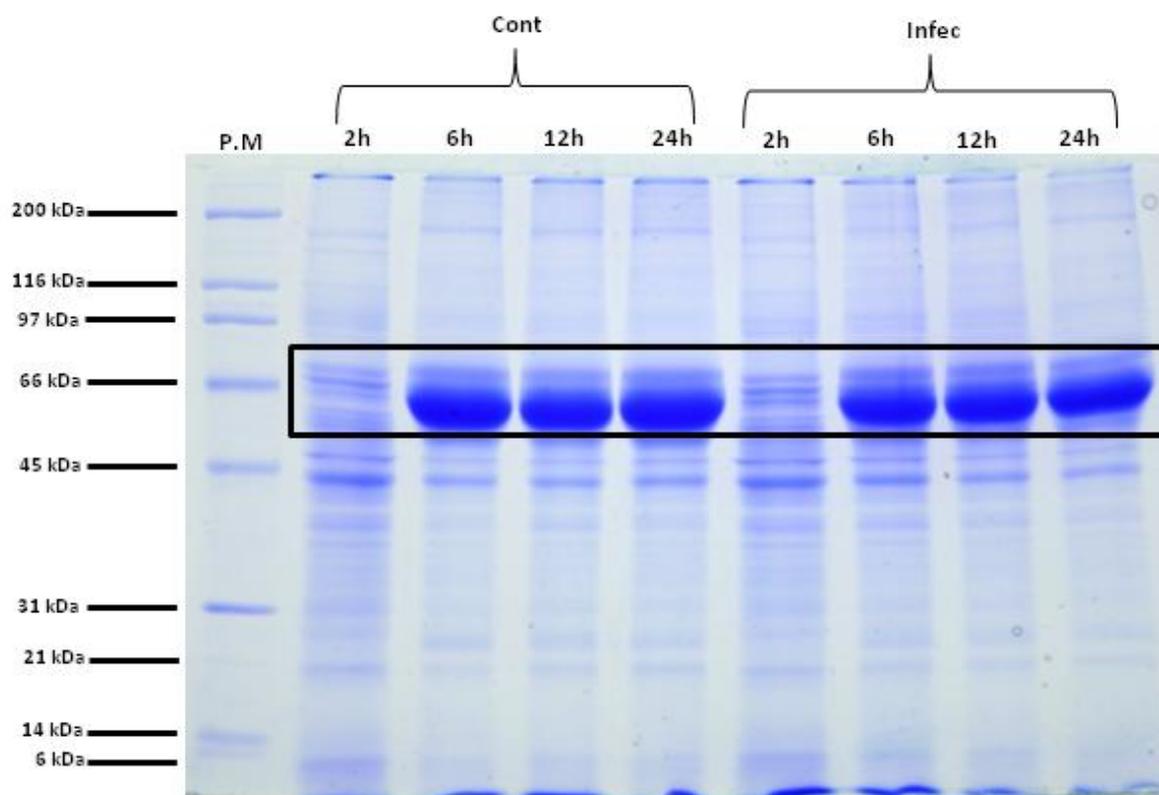
**Figura 1. Macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* cepa RH observados por imunofluorescência e DIC. *Toxoplasma gondii* é capaz de modular negativamente a expressão da iNOS e positivamente a expressão da ARG1 e persistir em macrófagos ativados.** Expressão de iNOS (verde), núcleo (azul) e ARG1 (vermelho). *T. gondii* (setas-DIC). **A, B e C.** Macrófagos ativados por 2h e não infectados. Alta expressão de iNOS (**A**) e baixa expressão de ARG1 (**B**) sem *T. gondii* (**C**). **D, E e F.** Macrófagos ativados por 6h e não infectados. Alta expressão de iNOS (**D**) e baixa expressão de ARG1 (**E**) sem *T. gondii* (**F**). **G, H e I.** Macrófagos ativados por 12h e não infectados. Alta expressão de iNOS (**G**) e baixa expressão de ARG1 (**H**) sem *T. gondii* (**I**). **J, K e L.** Macrófagos ativados por 24h e não infectados. Alta expressão de iNOS (**J**) e baixa expressão de ARG1 (**K**) sem *T. gondii* (**L**). **M, N e O.** Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* por 2h. Baixa expressão de iNOS (**M**) e alta expressão de ARG1 (**N**) com *T. gondii* (**O**). **P, Q e R.** Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* por 6h. Baixa expressão de iNOS (**P**) e alta expressão de ARG1 (**Q**) com *T. gondii* (**R**). **S, T e U.** Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* por 12h. baixa expressão de iNOS (**S**) e alta expressão de ARG1 (**T**) com *T. gondii* (**U**). **V, X e Z.** Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* por 24h. Baixa expressão de iNOS (**V**) e alta expressão de ARG1 (**X**) com *T. gondii* (**Z**). Barra de escala: 10µm.

Para confirmar os resultados da expressão de iNOS obtidos através de imunofluorescência, a dosagem de nitrito produzido pelos macrófagos classicamente ativados, infectados ou não com *T. gondii* cepa RH, foi avaliada (Figura 2). Este resultado confirma a modulação da expressão da iNOS em macrófagos infectados, que conseqüentemente produzem baixo níveis de nitrito se comparados com macrófagos controle não infectados.



**Figura 2. *Toxoplasma gondii* cepa RH inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados.**  
\*Significativamente diferente ( $P < 0.05$ ).

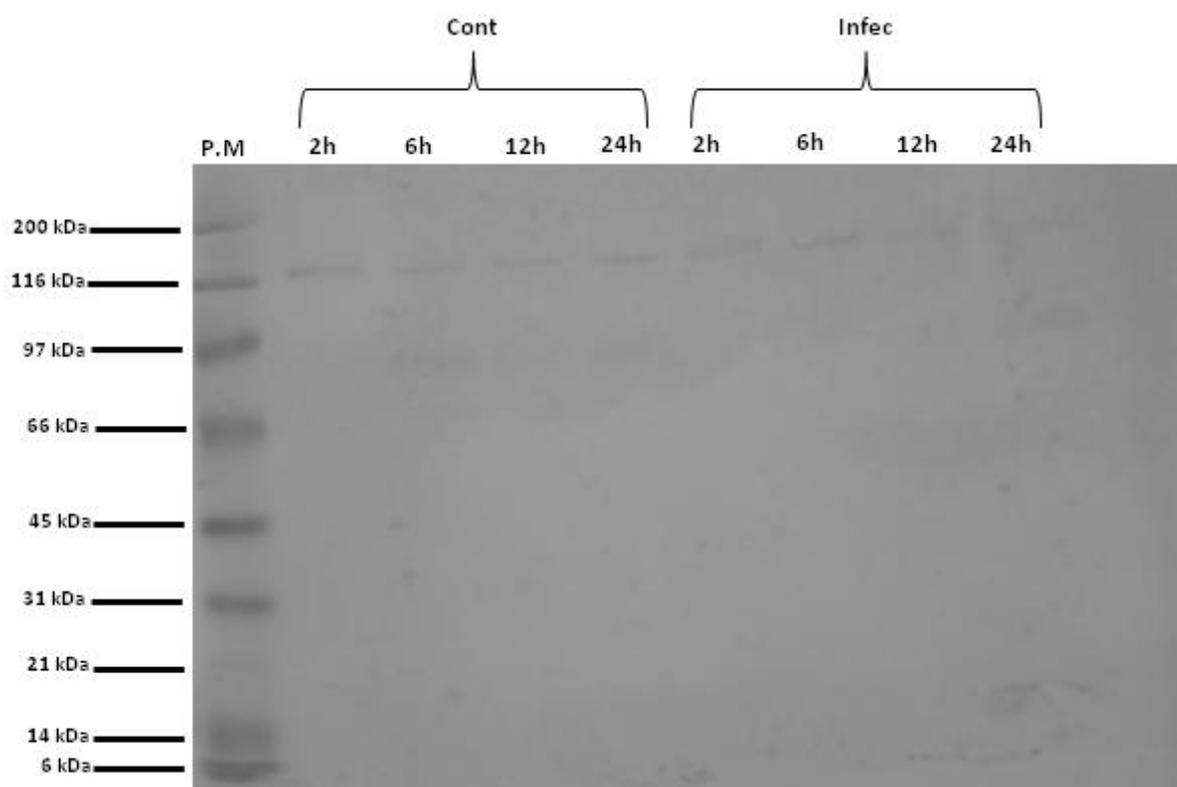
A fim de confirmar os resultados obtidos para o perfil de expressão da iNOS e ARG1 em macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* cepa RH, realizamos eletroforese do lisado celular em gel de poliacrilamida, que posteriormente foi transferido para membrana de nitrocelulose e revelado por imunoeletrotransferência.



**Figura 3. Separação do lisado celular de macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* cepa RH em gel de poliacrilamida.**

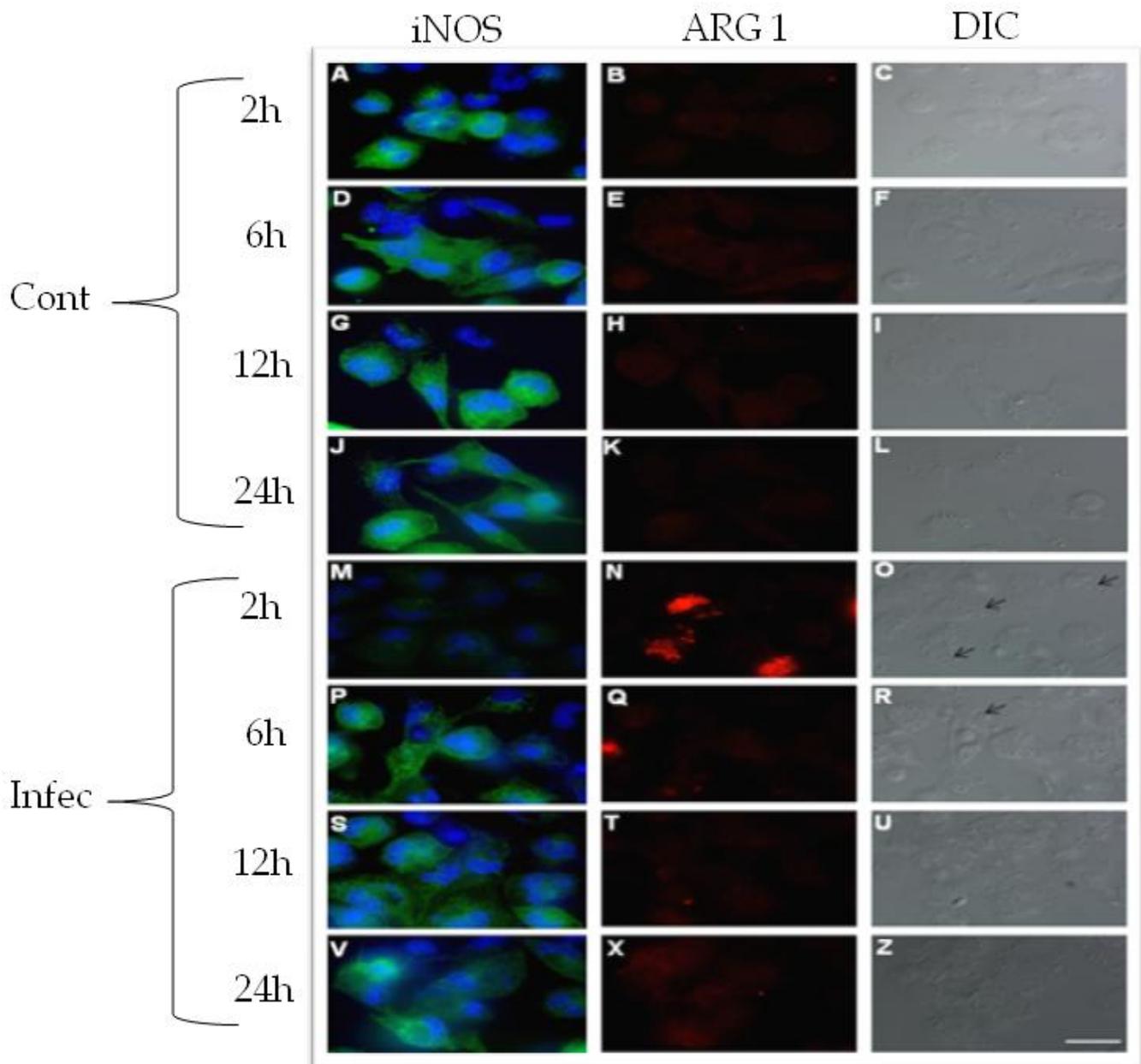
Amostras controle e infectado nos tempos de 6, 12 e 24h apresentaram perfil similar, com bandas proteicas evidentes com peso molecular de 60,000 Da, porém, a mesma banda proteica não foi observada no tempo de 2h de macrófagos controle e infectado (Figura 3). Seguindo da separação das amostras em gel de poliacrilamida não corado, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reveladas usando diaminobenzidina e  $H_2O_2$  (Figura 4). A imunoeletrotransferência confirma o resultado obtido por microscopia de fluorescência. O lisado de macrófagos ativados e não infectados (controle) por 2, 6, 12 e 24h apresentou iNOS, assim como o lisado de macrófagos ativados e infectados com RH nos tempos de 2h e 6h. Porém, o lisado de macrófagos ativados e infectados por 12 e 24h apresentaram quantidade reduzida iNOS. A presença de iNOS no lisado de

macrófagos ativados e infectados se deve, provavelmente, pelo fato de que a inibição da iNOS não é completa, mas sim reduzida ao longo da infecção, como confirmado através do nitrito presente no sobrenadante dessas células.



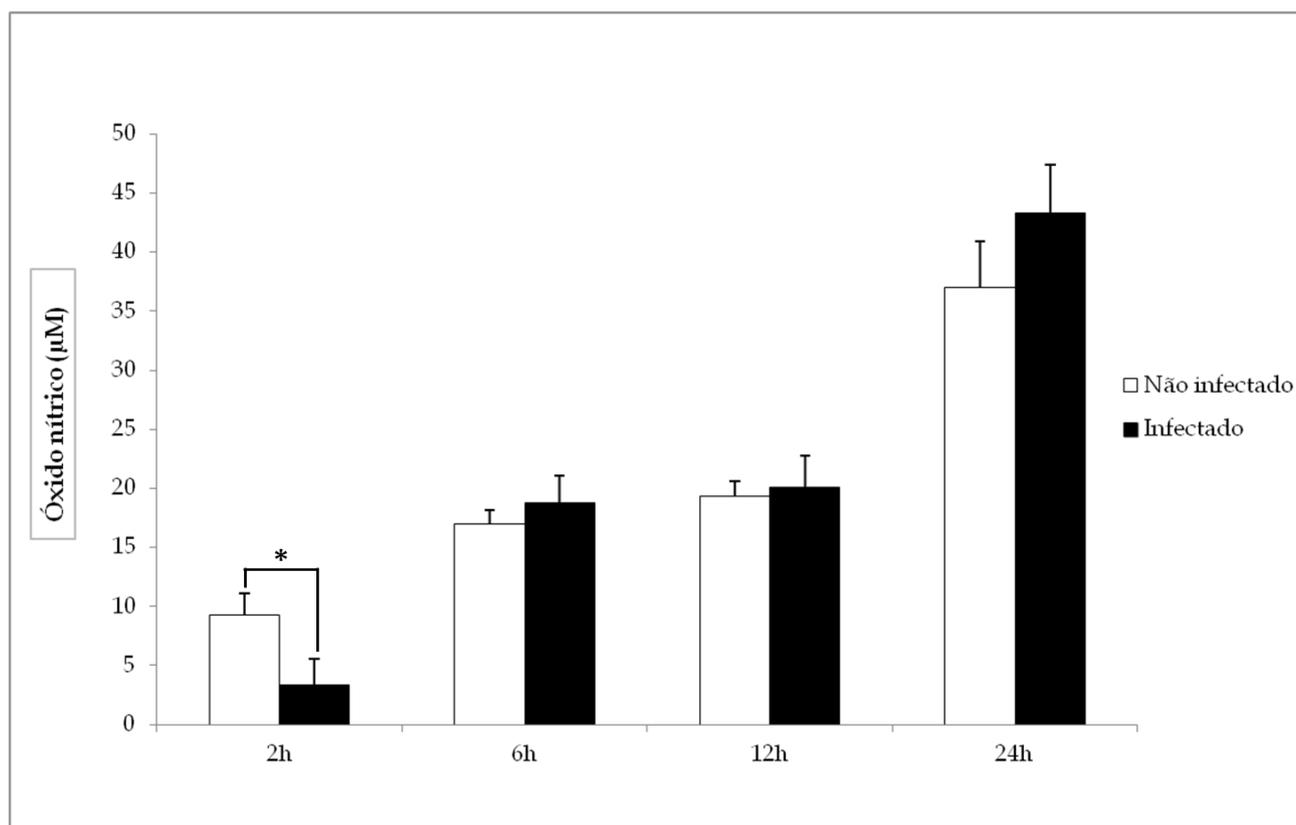
**Figura 4. Imunoeletrotransferência do lisado de macrófagos ativados e infectados ou não com *T. gondii* cepa RH nos tempos de 2, 6, 12 e 24h. P.M: peso molecular.**

Para avaliar se a inibição da expressão proteica de iNOS e aumento na expressão proteica de ARG1 é dependente da cepa de *T. gondii*, macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados foram infectados com parasitos da cepa tipo II (ME-49) menos virulenta. *Toxoplasma gondii* inibiu a expressão de iNOS e induziu expressão da ARG1 apenas nos estágios iniciais da infecção (Figura 5), sendo posteriormente degradado pelo mecanismo microbicida mediado pelo NO, após retorno da expressão da iNOS em 6, 12 e 24h de ativação. Deste modo, conclui-se que cepas menos virulentas de *T. gondii* não persistem em macrófagos classicamente ativados, pois inibem a expressão proteica de iNOS apenas nos estágios iniciais da infecção, se comparados com cepas mais virulentas.



**Figura 5. Imunofluorescência de macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativado e infectado ou não com *T. gondii* cepa ME-49.** *Toxoplasma gondii* de cepas menos virulentas modulam negativamente a expressão da iNOS e positivamente a expressão de ARG 1 apenas nos momentos iniciais da infecção e não persistem em macrófagos ativado. Expressão de iNOS (verde), núcleo (azul) e ARG1 (vermelho). *T. gondii* (setas-DIC). **A, B e C.** Macrófagos ativado por 2h e não infectado. Alta expressão de iNOS (**A**) e baixa expressão de ARG1 (**B**) sem *T. gondii* (**C**). **D, E e F.** Macrófagos ativado por 6h e não infectado. Alta expressão de iNOS (**D**) e baixa expressão de ARG1 (**E**) sem *T. gondii* (**F**). **G, H e I.** Macrófagos ativado por 12h e não infectado. Alta expressão de iNOS (**G**) e baixa expressão de ARG1 (**H**) sem *T. gondii* (**I**). **J, K e L.** Macrófagos ativado por 24h e não infectado. Alta expressão de iNOS (**J**) e baixa expressão de ARG1 (**K**) sem *T. gondii* (**L**). **M, N e O.** Macrófagos ativado e infectado com *T. gondii* por 2h. Baixa expressão de iNOS (**M**) e alta expressão de ARG1 (**N**) com *T. gondii* (**O**). **P, Q e R.** Macrófagos ativado e infectado com *T. gondii* por 6h. Alta expressão de iNOS (**P**) e baixa expressão de ARG1 (**Q**) com *T. gondii* (**R**). **S, T e U.** Macrófagos ativado e infectado com *T. gondii* por 12h. Alta expressão de iNOS (**S**) e baixa expressão de ARG1 (**T**) com *T. gondii* (**U**). **V, X e Z.** Macrófagos ativado e infectado com *T. gondii* por 24h. Alta expressão de iNOS (**V**) e baixa expressão de ARG1 (**X**) com *T. gondii* (**Z**). Barra de escala: 10µm.

Para confirmar os resultados obtidos através de imunofluorescência, realizamos a dosagem de nitrito produzido pelos macrófagos classicamente ativados, infectados ou não com *T. gondii* cepa ME-49 (Figura 6). Este resultado confirma a inibição da produção de NO por *T. gondii* apenas nos momentos iniciais da infecção, que retornam a níveis similares ao controle devido à degradação do parasito.



**Figura 6.** *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 inibe a produção de óxido nítrico apenas nos momentos iniciais da infecção em macrófagos peritoneais de camundongo classicamente ativados. \*Significativamente diferente ( $P < 0.05$ ).

## 6 – Discussão

Macrófagos são células do sistema imunológico (Hume, 2006) e quando ativados classicamente com IFN- $\gamma$  e LPS se tornam mais microbicidas, pois expressam, entre várias proteínas, iNOS que produz NO (Biswas & Mantovani, 2010). *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose, tem seu crescimento reduzido pela ação de NO, pois é capaz de inibir diversas vias bioquímicas desse parasito (Nathan & Hibbs, 1991) levando-o a morte (Zhao *et al.*, 2009). Porém, *T. gondii* apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imune. A inibição da produção de NO é um dos mecanismos chave de

sobrevivência do parasito (Seabra *et al.*, 2002; 2004). Estudos do grupo têm demonstrado que a inibição de NO ocorre, pois *T. gondii* induz sinalização autócrina de TGF- $\beta$  no macrófago infectado, desativando-os (Seabra *et al.*, 2004). Com a desativação da célula infectada, *T. gondii* promove a degradação da iNOS via proteossomo, como forma de modular a expressão desta enzima (Padrão *et al.*, 2014), o que permite a entrada e persistência do parasito na célula hospedeira. Outro mecanismo de evasão descrito para helmintos e parasitos intracelulares como *Taenia crassiceps* (Sosa *et al.*, 2002), *Schistosoma mansoni* (James & Glaven, 1989) e *Leishmania major* (Scharton & Scott, 1995) é a indução de arginase-1 (ARG-1) na célula infectada. Sabe-se que ARG-1 é capaz de modular negativamente a produção de NO, pois compete com a iNOS pelo substrato arginina (Santhanam *et al.*, 2008). Porém, há poucos estudos sobre indução de ARG-1 em macrófagos infectados com diferentes cepas de *T. gondii*.

Para identificar se *T. gondii* é capaz de modular a expressão de iNOS e ARG1, macrófagos classicamente ativados foram infectados com cepa RH ou ME-49 de *T. gondii* e monitorados para a expressão das proteínas alvo. Macrófagos ativados por 24h e não infectados (controle), apresentaram expressão de iNOS em seu citoplasma nos tempos de 26, 30, 36 e 48 h de ativação, porém, não apresentaram expressão de ARG1. Após infecção dos macrófagos ativados com *T. gondii* cepa RH por 2, 6, 12 e 24 h, houve redução na expressão da iNOS no citoplasma destas células e ao mesmo tempo, aumento na expressão da ARG1. Como demonstrado pelo grupo, a redução da expressão da iNOS se deve a indução da sinalização autocrina de TGF- $\beta$  nos macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2004), que desativa estas células, induzindo a degradação da iNOS via proteossomo (Padrão *et al.*, 2014). Já a indução da expressão de ARG1 se deve, provavelmente, a ativação de STAT6 na célula infectada (Murray *et al.*, 2011). Durante o processo de invasão, *T. gondii* secreta GRA 15, fator de virulência que fosforila e ativa STAT6, que passa a controlar a expressão da ARG1 (Murray *et al.*, 2011). Os resultados obtidos através de imunofluorescência da expressão da iNOS foram confirmados através da dosagem de nitrito no sobrenadante dos macrófagos. Macrófagos controle produziram quantidades significativamente maiores de nitrito em relação aos macrófagos infectados com *T. gondii*, confirmando a

redução na expressão da iNOS e consequente redução na produção de NO na célula infectada. Os resultados de iNOS e NO tanto para RH como para ME-49 confirmam os dados de Damasceno Sá *et al.*, (submetido). NO é essencial para o controle de *T. gondii* no início da infecção, porém, apenas cepas virulentas como RH são capazes burlar o sistema microbicida mediado pelo NO e persistir na célula hospedeira.

Ainda a fim de confirmar o desaparecimento da iNOS nas células infectadas com *T. gondii* cepa RH, macrófagos infectados ou não com o parasito foram lisados, as amostras analisadas em gel de poliacrilamida 12% e a iNOS, ARG 1 e ubiquitina foram avaliadas através de imunoeletrotransferência. Amostras de macrófagos controle e infectado com 6, 12, e 24h apresentaram padrão similar de separação no gel de poliacrilamida, com proteínas majoritárias desconhecidas com cerca de 60,000 Da. Porém, amostras de macrófagos controle e infectado com 2h não apresentaram padrão similar de proteínas com 60,000Da. Após transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose, as amostras foram marcadas com anticorpo específico anti-iNOS, anti-ubiquitina e anti-arginase e reveladas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase e uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DAB, a fim de confirmar o perfil de expressão da iNOS e ARG1 obtidos através de imunofluorescência. Lisado celular de macrófagos ativados por 2, 6, 12, 24 h e não infectados com *T. gondii* apresentou iNOS, que foi marcada com peso molecular com cerca de 120,000 Da. Lisado de macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* por 2 e 6 h também apresentou iNOS. Isso se deve ao fato de que a inibição da expressão da iNOS não é completa nas células infectadas, e sim reduzida, assim como a produção de NO também é reduzida e não completamente inibida nas células infectadas, em relação aos macrófagos não infectados. Esse resultado reforça que somente as células infectadas têm a iNOS degradada, as não infectadas estão expressando e produzindo NO que foram detectados. Porém, com 12 e 24 h de infecção houve redução na quantidade de iNOS presente no lisado de macrófagos infectados, se comparados com macrófagos não infectados com o mesmo tempo de ativação. Infelizmente não foram obtidas marcações para ARG1 e ubiquitina em nenhum dos lisados avaliados. Deste modo, esses experimentos

serão repetidos, pois espera-se que ambas proteínas sejam detectadas nos lisados de macrófagos infectados.

A fim de avaliar se a modulação na expressão da iNOS e ARG 1 é dependente da cepa de *T. gondii*, macrófagos classicamente ativados foram infectados com *T. gondii* cepa ME-49, de virulência intermediária, e posteriormente avaliados através de microscopia de fluorescência. Macrófagos ativados e não infectados (controle), apresentaram expressão de iNOS em seu citoplasma nos tempos de 2, 6, 12 e 24 h de ativação, porém, não apresentaram expressão de ARG 1. Diferente dos macrófagos infectados com *T. gondii* cepa RH, macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* cepa ME-49 apresentaram redução na expressão da iNOS e aumento na expressão de ARG 1 apenas com 2h de infecção. Porém, macrófagos infectados com *T. gondii* dessa cepa por 6, 12 e 24 h voltam a expressar iNOS e tem sua expressão de ARG 1 reduzida. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que *T. gondii* de cepas menos virulentas como a ME-49, são degradadas por outros mecanismos microbicidas além do NO, como por exemplo, ação das IRGs (Taylor *et al.*, 2006; Saeij *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009). Cepas virulentas de *T. gondii* como a RH possuem ROP 5 e ROP 18 extremamente ativas e em alta quantidade se comparadas com cepas de virulência intermediária como a ME-49 (Saeij *et al.*, 2006; Kemp *et al.*, 2013). Cepas menos virulentas são incapazes de fosforilar e inativar as IRGs (Niedelman *et al.*, 2012). Isso ajuda a explicar a degradação dos parasitos da cepa ME-49, o que permite o retorno da expressão da iNOS e conseqüente aumento da produção de NO.

A fim de melhor entender a modulação da iNOS e ARG1 em macrófagos infectados por diferentes cepas de *T. gondii*, os próximos passos desse trabalho são: (a) realizar a dosagem da atividade de ARG1 em lisado de macrófagos infectados ou não com *T. gondii* cepa RH ou ME-49; (b) realizar o PCR a partir do cDNA de macrófagos infectados ou não com *T. gondii* cepa RH ou ME-49 a fim de analisar a modulação do mRNA da iNOS e ARG1.

## **7- Conclusão**

Macrófagos classicamente ativados e infectados com *T. gondii* apresentam padrões distintos de modulação de iNOS e ARG1 de acordo com a cepa do parasito. Cepas virulentas como RH são capazes de modular negativamente a expressão da iNOS e positivamente a expressão ARG1 em todos os tempos de infecção avaliados nesse trabalho. Porém, cepas menos virulentas como a ME-49 modulam negativamente a expressão da iNOS e positivamente a expressão de ARG1 apenas nos momentos iniciais da infecção e posteriormente são degradadas possivelmente pelos mecanismos microbicidas de IRGs e NO.

## 8- Referências

- ABU-MADI MA, AL-MOLAWI N, BEHNKE JM. **Seroprevalence and epidemiological correlates of *Toxoplasma gondii* infections among patients referred for hospital-based serological testing in Doha, Qatar.** Parasitol Vectors. 39:1-9, 2008.
- ADAMS LB, HIBBS JB, TAINTOR RR, KRAHENBUHL JS. **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.
- ADJOGBLE KD, MERCIER C, DUBREMETZ JF, HUCKE C, MACKENZIE CR, CESBRON-DELAUW MF, DAUBENER W. **GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes.** Int J Parasitol. 34:1255-1264, 2004.
- AHN HJ, KIM S, NAM HW. **Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*.** Biochem Biophys Res Commun. 331:614-620, 2005.
- ALEXANDER DL, MITAL J, WARD GE, BRADLEY P, BOOTHROYD JC. **Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles.** PLoS Pathog. 1:137- 149, 2005.
- ALMEIDA IC, CAMARGO MM, PROCÓPIO DO, SILVA LS, MEHLERT A, TRAVASSOS LR, GAZZINELLI RT, FERGUSON MA. **Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents.** EMBO J. 19:1476-1485, 2000.
- AL-MUTAIRI MS, CADALBERT LC, MCGACHY HA, SHWEASH M, SCHROEDER J, KURNIK M, SLOSS CM, BRYANT CE, ALEXANDER J, PLEVIN R. **MAP kinase phosphatase-2 plays a critical role in response to infection by *Leishmania mexicana*.** PloS Pathog. 6:1-11, 2010.
- AL-QURASHI AR, GHANDOUR AM, OBEID OE, AL-MULHIM A, MAKKI SM. **Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection in the human population in the Eastern Region.** Saudi Med J. 22:13-18, 2001.
- ANCUTA P, RAO R, MOSES A, MEHLE A, SHAW SK, LUSCINSKAS FW, GABUZDA D. **Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes.** J Exp Med. 197:1701-1707, 2003.
- ANTHONY RM, RUTITZKY LI, URBAN JF JR, STADECKER MJ, GAUSE WC. **Protective immune mechanisms in helminth infection.** Nat Rev Immunol. 7:975-987, 2007.
- AREND WP, MANNIK M. **The macrophage receptor for IgG: number and affinity of binding sites.** J Immunol. 110:1455-1463, 1973.
- ARNOLD L, HENRY A, PORON F, BABA-AMER Y, VAN ROOIJEN N, PLONQUET A, GHERARDI RK, CHAZAUD B. **Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis.** J Exp Med. 204:1057-1069, 2007.
- ASH DE. **Structure and function of arginases.** J Nutr. 134:2760-2767, 2004.
- AUFFRAY C, FOGG D, GARFA M, ELAIN G, JOIN-LAMBERT O, KAYAL S, SARNACKI S, CUMANO A, LAUVAU G, GEISSMANN F. **Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior.** Science. 317:666-670, 2007.

- AZIZ A, SOUCIE E, SARRAZIN S, SIEWEKE MH. **MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages.** Science. 326:867-871, 2009.
- BAHIA-OLIVEIRA LM, JONES JL, AZEVEDO-SILVA J, ALVES CC, ORÉFICE F, ADDISS DG. **Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil.** Emerg Infect Dis. 1:55-62, 2003.
- BALAÑA-FOUCE R, CALVO-ÁLVAREZ E, ÁLVAREZ-VELILLA R, PRADA CF, PÉREZ-PERTEJO Y, REGUERA RM. **Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis.** Mol Biochem Parasitol. 181:85-93, 2012.
- BAUM J, PAPENFUSS AT, BAUM B, SPEED TP, COWMAN AF. **Regulation of apicomplexan actin-based motility.** Nat Rev Microbiol. 4:621-628, 2006.
- BECK JR, CHEN AL, KIM EW, BRADLEY PJ. **RON5 Is Critical for Organization and Function of the Toxoplasma Moving Junction Complex.** PLoS Pathog. 10:1-15, 2014.
- BEHNKE MS, FENTRESS SJ, MASHAYEKHI M, LI LX, TAYLOR GA, SIBLEY LD. **The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence in Toxoplasma gondii by Regulating the Active Kinase ROP18.** PLoS Pathog. 8:1-15, 2012.
- BELLONI A, AUBERT D, GOMEZ MJE, LE NAOUR R, BONHOMME A, GUENOUNOU M, PINON JM. **Involvement of tumor necrosis factor-K during infection of human monocytic cells by Toxoplasma gondii.** Parasitol Res. 86:406-412, 2000.
- BENARD A, PETERSEN E, SALAMON R, CHENE G, GILBERT R, SALMI LR. **Survey of European programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis.** European Toxo Prevention Study Group (EUROTOXO). Euro Surveill.13: 257-263, 2008.
- BESTEIRO S, MICHELIN A, PONCET J, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. **Export of a Toxoplasma gondii rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion.** PLoS Pathog. 5:1-14, 2009.
- BEWLEY MC, JEFFREY PD, PATCHETT ML, KANYO ZF, BAKER EN. **Crystal structures of Bacillus caldovelox arginase in complex with substrate and inhibitors reveal new insights into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily.** Structure. 7:435-448, 1999.
- BIGLEY V, HANIFFA M, DOULATOV S, WANG XN, DICKINSON R, MCGOVERN N, JARDINE L, PAGAN S, DIMMICK I, CHUA I, WALLIS J, LORDAN J, MORGAN C, KUMARARATNE DS, DOFFINGER R, VAN DER BURG M, VAN DONGEN J, CANT A, DICK JE, HAMBLETON S, COLLIN M. **The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency.** J Exp Med. 208: 227-234, 2011.
- BISWAS SK, SICA A, LEWIS CE. **Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms.** J Immunol.180:2011-2017, 2008.
- BISWAS SK, MANTOVANI A. **Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm.** Nat Immunol. 11:889-896, 2010.

- BLANDEN RV, LEFFORD MJ, AND MACKANESS GB. **The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice.** J exp Med. 129:1079-1107, 1969.
- BLUMENSCHNIG TM, FRIEDRICH N, CHILDS RA, SAOUROS S, CARPENTER EP, CAMPANERO-RHODES MA, SIMPSON P, CHAI W, KOUTROUKIDES T, BLACKMAN MJ ET AL. **Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*.** EMBO J. 26:2808-2820, 2007.
- BOGDAN C, PAIK J, VODOVOTZ Y, NATHAN C. **Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10.** J Biol Chem. 267:23301-23308, 1992.
- BOOTHROYD JC, DUBREMETZ JF. **Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries.** Nat Rev Microbiol. 6:79-88, 2008.
- BRADLEY PJ, WARD C, CHENG SJ, ALEXANDER DL, COLLIER S, COOMBS GH, DUNN JD, FERGUSON DJ, SANDERSON SJ, WASTLING JM, BOOTHROYD JC. **Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*.** J Biol Chem. 280: 34245-34258, 2005.
- BRAUN L, BRENIER-PINCHART MP, YOGAVEL M, CURT-VARESANO A, CURT-BERTINI RL, HUSSAIN T, KIEFFER-JAQUINOD S, COUËTE Y, PELLOUX H, TARDIEUX I, SHARMA A, BELRHALI H, BOUGDOUR A, HAKIMI MA. **A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting direct and sustained host p38 MAPK activation.** J Exp Med. 210: 2071-2086, 2013.
- BROWN AK, HUNT SD, STEPHENS DJ. **Opposing microtubule motors control motility, morphology and cargo segregation during ER-to-Golgi transport.** Biol Open. 3: 307-13, 2014.
- BRUNET J, PFAFF AW, ABIDI A, UNOKI M, NAKAMURA Y, GUINARD M, KLEIN JP, CANDOLFI E, MOUSLI M. ***Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation.** Cell Microbiol. 10:908-920, 2008.
- BUTCHER BA, DENKERS EY. **Mechanism of entry determines ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production.** Infect Immun. 70: 5216-5224, 2002.
- BUTCHER BA, FOX BA, ROMMEREIM LM, KIM SG, MAURER KJ, YAROVINSKY F, HERBERT DR, BZIK DJ, DENKERS EY. ***Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control.** Plos Pathogens. 7:1-16, 2011.
- CABRAL ASG, BALBINO F, ABDALLA LF, COSTA SSS, VAZ JAR, FONSECA SF. **Seroprevalence of toxoplasmosis in women of reproductive age in the city of Brasilia, capital of Brazil.** International Congress of Infectious Diseases. Kuala Lumpur, Malaysia. Abstract 179, 2008.
- CAMA E, COLLELUORI DM, EMIG FA, SHIN H, KIM SW, KIM NN, TRAISH AM, ASH DE, CHRISTIANSON DW. **Human arginase II: Crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal.** Biochemistry. 42:8445-8451, 2003.

- CAREY KL, DONAHUE CG, WARD GE. **Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii***. Mol Biochem Parasitol. 105: 25-37, 2000.
- CAREY KL, JONGCO AM, KIM K, WARD GE. **The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells**. Eukaryot cell. 3:1320-1330, 2004.
- CARLIN LM, STAMATIADIS EG, AUFRAY C, HANNA RN, GLOVER L, VIZCAY-BARRENA G, HEDRICK CC, COOK HT, DIEBOLD S, GEISSMANN F. **Nr4a1-dependent Ly6C Low monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal**. Cell.153:362-375, 2013.
- CARRUTHERS VB, SIBLEY LD. **Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts**. Eur J Cell Biol. 73:114-123, 1997.
- CARRUTHERS VB, GIDDINGS OK, SIBLEY LD. **Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells**. Cell Microbiol. 1:225-235, 1999.
- CEREDE O, DUBREMETZ JF, SOETE M, DESLEE D, VIAL H, BOUT D, LEBRUN M. **Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence**. J Exp Med. 201:453-463, 2005.
- CESBRON-DELAUW MF. **Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship**. Parasitol Today.10:293-296, 1994.
- CHARRON AJ, SIBLEY LD. **Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii***. J Cell Sci. 115:3049-3059, 2002.
- CHARRON AJ, SIBLEY LD. **Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii***. Traffic. 5:855-867, 2004.
- CHATTON E, BLANC G. **Notes et reflexions sur le toxoplasme and le toxoplasmosis du gondi**. Arch Inst Pasteur Tunis 10:1-41, 1917.
- CHILDS AC, MEHTA DJ, GERNER EW. **Polyamine-dependent gene expression**. Cell Mol Life Sci. 60:1394-1406, 2003.
- CHOW A, TOOMRE D, GARRETT W, MELLMAN I. **Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane**. Nature. 418:988-994, 2002.
- CHRISTIANSON DW. **Arginase: Structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal**. Acc Chem Res. 38:191-201, 2005.
- CINTRA WM, DE SOUZA W. **Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii***. Eur J Cell Biol. 37:63-69, 1985.
- COPPENS I, SINAI AP, JOINER KA. ***Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor mediated endocytosis for cholesterol acquisition**. J Cell Biol.149:167-180, 2000.
- COPPENS I, JOINER KA. **Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge**. Mol Biol Cell. 14:3804-3820, 2003.
- COPPENS I, DUNN JD, ROMANO JD, PYPART M, ZHANG H, BOOTHROYD JC, JOINER KA. ***Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space**. Cell. 125:261-74, 2006.

- CORRALIZA IM, CAMPO ML, SOLER G, MODOLELL M. **Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod.** J Immunol Methods. 174:231-235, 1994.
- CRESSWELL P. **Invariant chain structure and MHC class II function.** Cell. 84:505-507, 1996.
- CROMBEZ EA, CEDERBAUM SD. **Hyperargininemia due to liver arginase deficiency.** Mol Genet Metab. 84:243-251, 2005.
- CROS J, CAGNARD N, WOOLLARD K, PATEY N, ZHANG SY, SENECHAL B, PUEL A, BISWAS SK, MOSHOUS D, PICARD C, JAIS JP, D'CRUZ D, CASANOVA JL, TROUILLET C, GEISSMANN F. **Human CD14 dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors.** Immunity. 33:375-386, 2010.
- DAFF S. **NO synthase: structures and mechanisms.** Nitric Oxide. 23:1-11, 2010.
- DAGHIGH F, FUKUTO JM, ASH DE. **Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, Ng hydroxy-L-arginine: Implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase.** Biochem Biophys Res Commun. 202:174-180, 1994.
- DALOD M, CHELBI R, MALISSEN B, LAWRENCE T. **Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming.** EMBO J. 33:1104-1116, 2014.
- DE SOUZA W. **Demonstration and structure of the microtubular system of *Toxoplasma gondii*.** C R Acad Sci D. 275:2899-2901, 1972.
- DE MACCHI BM, MIRANDA FJ, DE SOUZA FS, DE CARVALHO EC, ALBERNAZ AP, DO NASCIMENTO JL, DAMATTA RA. **Chickens treated with a nitric oxide inhibitor became more resistant to *Plasmodium gallinaceum* infection due to reduced anemia, thrombocytopenia and inflammation.** Vet Res. 44:1-14, 2013.
- DE SOUZA W. **Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the biogenesis of the parasitophorous vacuole.** Histochem Cell Biol. 123:1-18, 2005.
- DENKERS EY, GAZZINELLI R. **Regulation and function of T cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.** Clin Microbiol Rev. 11:569-588, 1998.
- DESJARDINS M, HOUDE M, GAGNON E. **Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity.** Immunol Rev. 207: 158-165, 2005.
- DESOLME B, MEVELEC MN, BUZONI-GATEL D, BOUT D. **Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene.** Vaccine. 18:2512-252, 2000.
- DI COSTANZO L, SABIO G, MORA A, RODRIGUEZ PC, OCHOA AC, CENTENO F, CHRISTIANSON DW. **Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response.** Proc Natl Acad Sci. 102:13058-13063, 2005.
- DI VIRGILIO F. **New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets.** Curr Pharm Des. 10:1647-1652, 2004.

- DO H, FALCONE D, LIN J, ANDREWS DW, JOHNSON AE. **The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipids bilayer is a multistep process.** Cell. 85:369-378, 1996.
- DORAN DJ. **Behavior of coccidia in vitro. The biology of the coccidia.** University Park Press, Baltimore, Md. 229–285, 1982.
- DOWLING DP, DI COSTANZO L, GENNADIOS HA, CHRISTIANSON DW. **Evolution of the arginase fold and functional diversity.** Cell Mol Life Sci. 65:2039-2055, 2008.
- DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA. **Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.** Clin Microbiol Rev. 11:267-299, 1998.
- DUBEY JP, GRAHAM DH, DAHL E, HILALI M, EL-GHAYSH A, SREEKUMAR C, KWOK OC, SHEN SK, LEHMANN T. **Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt.** Vet Parasitol. 114: 89-95, 2003.
- DUBEY JP. **Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis.** Vet Parasitol. 126:57-72, 2004.
- DUBREMETZ JF, ACHABAROU A, BERMUDEZ D, JOINER KA. **Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction.** Parasitol Res. 79:402-408, 1993.
- DUNAY IR, DAMATTA RA, FUX B, PRESTI R, GRECO S, COLONNA M, SIBLEY LD. **Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*.** Immunity. 29:306-317, 2008.
- EL HAJJ H, DEMEY E, PONCET J, LEBRUN M, WU B, GALÉOTTI N, FOURMAUX MN, MERCEREAU-PUIJALON O, VIAL H, LABESSE G, DUBREMETZ JF. **The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling.** Proteomics. 6:5773-5784, 2006.
- EL HAJJ H, LEBRUN M, AROLD ST, VIAL H, LABESSE G, DUBREMETZ JF. **ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*.** PLoS Pathog. 3:0200-0211, 2007.
- EL KASMI KC, QUALLS JE, PESCE JT, SMITH AM, THOMPSON RW, HENAO-TAMAYO M, BASARABA RJ, KONIG T, SCHLEICHER U, KOO M-S, KAPLAN G, FITZGERALD KA, TUOMANEN EI, ORME IM, KANNEGANTIT-D, BOGDAN C, WYNN TA, MURRAY PJ. **Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens.** Nat Immunol. 9:1399-1406, 2008.
- ERWIG LP, HENSON PM. **Clearance of apoptotic cells by phagocytes.** Cell Death Differ. 15:243-250, 2008.
- EVANS R. **Life cycle and animal infection. Human toxoplasmosis.** Oxford University Press. 26-55, 1992.
- FAYE O, LEYE A, DIENG Y, RICHARD-LENOBLE D, DIALLO S. **Toxoplasmosis in Dakar. Seroepidemiologic sampling of 353 women of reproductive age.** Bull Soc Pathol Exot. 91: 249-250, 1998.
- FAYER R. **Penetration of cultured cells by *Eimeria meleagridis* and *E. tenella* sporozoites.** J Parasitol. 58: 921- 927, 1972.
- FENTRESS SJ, BEHNKE MS, DUNAY IR, MASHAYEKHI M, ROMMEREIM LM, FOX BA, BZIK DJ, TAYLOR GA, TURK BE, LICHTI CF, TOWNSEND RR, QIU W, HUI R, BEATTY WL, SIBLEY LD. **Phosphorylation of**

- Immunity-Related GTPases by a *Toxoplasma gondii* Secreted Kinase Promotes Macrophage Survival and Virulence.** Cell Host Microbe. 8: 484-495, 2010.
- FENTRESS SJ, STEINFELDT T, HOWARD JC & SIBLEY LD. **The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*.** Cell Microbiol. 14:1921-1933, 2012.
- FLANNAGAN RS, JAUMOUILLE V, GRINSTEIN S. **The cell biology of phagocytosis.** Annu Rev Pathol. 7:61-98, 2012.
- FLEIDERVISH IA, LIBMAN L, KATZ E, GUTNICK MJ. **Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated N channels.** Proc Natl Acad Sci. 105:18994-18999, 2008.
- FORSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H. **Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).** FASEB J. 12:773-790, 1998.
- FORSTERMANN U, LI H, SCHWARZ PM, KLEINERT H. **NO synthesis and NOS regulation. Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species.** Dordrecht. 119-154, 2003.
- FORSTERMANN U, MUNZEL T. **Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace.** Circulation. 113:1708-14, 2006.
- FORSTERMANN U, SESSA WC. **Nitric oxide synthases: regulation and function.** Eur Heart J. 33:829-837, 2012.
- FOUSSARD F, LERICHE MA, DUBREMETZ JF. **Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries.** Parasitology. 102:367-370, 1991.
- CRUZ AF, AGUILAR-SANTELISES M, RAMOS-ESPINOSA O, MATA-ESPINOSA D, MARQUINA-CASTILLO B, BARRIOS-PAYAN J, HERNANDEZ-PANDO R. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor.** 31:774-776, 2014.
- FRENAL K, POLONAIIS V, MARQ J-B, STRATMANN R, LIMENITAKIS J & SOLDATI-FAVRE D. **Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture.** Cell Host Microbe. 8:343-357, 2010.
- FRENKEL JK. **Biology of *Toxoplasma gondii*. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control.** Paris: Springer-Verlag. 9-25, 2000.
- FRIEDRICH N, MATTHEWS S, SOLDATI-FAVRE D. **Sialic acids: key determinants for invasion by the Apicomplexa.** Int J Parasitol. 40:1145-1154, 2010.
- GEISSMANN F, JUNG S, LITTMAN DR. **Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.** Immunity.19:71-82, 2003.
- GEISSMANN F, GORDON S, HUME DA, MOWAT AM, RANDOLPH GJ. **Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity.** Nat Rev Immunol. 10:453-460, 2010.
- GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M, LEY K. **Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.** Science. 327:656-661, 2010.
- GHOSH S, KARIN M. **Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle.** Cell Suppl.109:81-96, 2002.
- GHOSH A, UTHAIAH R, HOWARD J, HERRMANN C, WOLF E. **Crystal structure of IIGP1: a paradigm for interferon-inducible p47 resistance GTPases.** Mol Cell. 15:727-739, 2004.

- GILBERT LA, RAVINDRAN S, TURETZKY JM, BOOTHROYD JC, BRADLEY PJ. ***Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells.** Eukaryot Cell. 6: 73-83, 2007.
- GINHOUX F, GRETER M, LEBOEUF M, NANDI S, SEE P, GOKHAN S, MEHLER MF, CONWAY SJ, NG LG, STANLEY ER, SAMOKHVALOV IM, MERAD M. **Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.** Science. 330:841-845, 2010.
- GORDON S. **Alternative activation of macrophages.** Nat Rev Immunol. 1:23-35, 2003.
- GORDON S, TAYLOR PR. **Monocyte and macrophage heterogeneity.** Nat Rev Immunol. 5:953-964, 2005.
- GORDON S. **Elie Metchnikoff: father of natural immunity.** Eur J Immunol. 38:3257-3264, 2008.
- GORDON S, PLÜDDEMANN A. **Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects.** Semin Immunopathol. 35:533-540, 2013.
- GOTOH T, ARAKI M, MORI M. **Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA.** Biochem Biophys Res Commun. 233:487-491, 1997.
- GOTTHARDT D, WARNATZ HJ, HENSCHEL O, BRUCKERT F, SCHLEICHER M, SOLDATI T. **High resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases.** Mol Biol Cell. 13:3508-3520, 2002.
- GUILLEMO LV, DAMATTA RA. **Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophages cell lines.** Poult Sci. 83: 776-782, 2004.
- GRIESS LCDA, WAGNER J, GLOGOWSKI PL, SKIPPER JS, WISHMOK SR, TANNENBAUN. **Analyses of nitrate, nitrite, and [15N] nitrite in biological fluids.** Anal Biochem. 126:131-138, 1982.
- GRIMM EA, ELLERHORST J, TANG CH, EKMEKCIOGLU S. **Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis.** Nitric Oxide. 19:133-137, 2008.
- GROSS TJ, KREMENS K, POWERS LS, BRINK B, KNUTSON T, DOMANN FE, PHILIBERT RA, MILHEM MM, MONICK MM. **Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses.** J Immunol. 192:2326-2338, 2014.
- GUSTAFSSON C, MJOSBERG J, MATUSSEK A, GEFFERS R, MATTHIESEN L, BERG G, SHARMA S, BUER J, ERNERUDH J. **Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype.** PLoS ONE. 3:1-9, 2008.
- HAGAR JA, POWELL DA, AACHOUI Y, ERNST RK, MIAO EA. **Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock.** Science. 341:1250-1253, 2013.
- HALONEN SK, WEIDNER E. **Overcoating of *Toxoplasma gondii* with host cell vimentin type intermediate filaments.** J Eukaryot Microbiol. 41:65-71, 1994.
- HALONEN SK, TAYLOR GA, WEISS LM. **Gamma-interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes mediated by IGTP.** Infect Immun. 69:5573-5576, 2001.

- HAMILTON TA, ZHAO C, PAVICIC PG JR, DATTA S. **Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization.** Front Immunol. 5:1-6, 2013.
- HANSEN G, HERCUS TR, MCCLURE BJ, STOMSKI FC, DOTTORE M, POWELL J, RAMSHAW H, WOODCOCK JM, XU Y, GUTHRIDGE M, MCKINSTRY WJ, LOPEZ AF, PARKER MW. **The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation.** Cell. 134:496-507, 2008.
- HEINRICH PC, BEHRMANN I, HAAN S, HERMANN S HM, MULLER-NEUEN G, SCHAPER F. **Principles of interleukin-6 cytokine signalling and its regulation.** Biochem J. 374:1-20, 2003.
- HELAL EG, EL-DAFRAY SM, MOHAMED AH, ABOU-EL-NOUR BM, IBRAHIM S. **Ultrastructural study on *Biomphalaria alexandrina* haemocytes infected with *Schistosoma mansoni* in Egypt and its correlation with nitric oxide level.** J Egypt Soc Parasitol. 44:113-24, 2014.
- HENSON PM, HUME DA. **Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis.** Trends Immunol. 27:244-250, 2006.
- HERZFELD A, RAPER SM. **The heterogeneity of arginases in rat tissues.** Biochem J. 153:469-478, 1976.
- HOEFFEL G, WANG Y, GRETER M, SEE P, TEO P, MALLERET B, LEBOEUF M, LOW D, OLLER G, ALMEIDA F, CHOY SH, GRISOTTO M, RENIA L, CONWAY SJ, STANLEY ER, CHAN JK, NG LG, SAMOKHVALOV IM, MERAD M, GINHOUX F. **Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages.** J Exp Med. 209:1167-1181, 2012.
- HOFFLIN JM, CONLEY FK, REMINGTON JS. **Murine model of intracerebral toxoplasmosis.** J Infect Dis. 155:550-557, 1997.
- HOFFMAN SL, CRUTCHER JM, PURI SK, ANSARI AA, VILLINGER F, FRANKE ED, SINGH PP, FINKELMAN F, GATELY MK, DUTTA GP, HOWE DK, SIBLEY LD. ***Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease.** J Infect Dis. 172:1561-1566, 1995.
- HOFFMAN SL, CRUTCHER JM, PURI SK, ANSARI AA, VILLINGER F, FRANKE ED, SINGH PP, FINKELMAN F, GATELY MK, DUTTA GP, SEDEGAH M. **Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12.** Nat Med. 3:80-83, 1997.
- HU K, ROOS D, MURRAY JM. **A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*.** J Cell Biol. 156:1039-1050, 2002.
- HU X, IVASHKIV LB. **Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases.** Immunity. 31:539-550, 2009.
- HUANG S, HENDRIKS W, ALTHAGE A, HEMMI S, BLUETHMANN H, KAMIJO R, VILCEK J, ZINKERNAGEL RM, AGUET M. **Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor.** Science. 259:1742-1745, 1993.
- HUANG Z, HOFFMANN FW, FAY JD, HASHIMOTO AC, CHAPAGAIN ML, KAUFUSI PH, HOFFMANN PR. **Stimulation of unprimed macrophages with immune complexes triggers a low output of nitric oxide by calcium-dependent neuronal nitric oxide synthase.** J Biol Chem. 287:4492-502, 2012.

- HUME DA. **The mononuclear phagocyte system.** Curr Opin Immunol. 18:49-53, 2006.
- HUME DA. **Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system.** Mucosal Immunol. 1:432-441, 2008.
- HUME DA. **Macrophages as APC and the dendritic cell myth.** J Immunol. 181:5829-5835, 2008.
- HUME DA, MACDONALD KP. **Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling.** Blood. 119:1810-182, 2012.
- HUNTER CA, REMINGTON JS. **The role of IL12 in toxoplasmosis.** Res Immunol. 146:546-552, 1995.
- HUNTER CA, SIBLEY LD. **Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors.** 11:766-78, 2012.
- HUYNH MH, CARRUTHERS VB. ***Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence.** PLoS Pathog. 2:0753-0762, 2006.
- INGERSOLL MA, SPANBROEK R, LOTTAZ C, GAUTIER EL, FRANKENBERGER M, HOFFMANN R, LANG R, HANIFFA M, COLLIN M, TACKE F, HABENICHT AJ, ZIEGLER-HEITBROCK L, RANDOLPH GJ. **Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets.** Blood. 115:10-19, 2010.
- JAMES SL, GLAVEN J. **Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates.** J Immunol. 143:4208-4212, 1989.
- JACOBS L, REMINGTON JS, MELTON ML. **The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*.** J Parasitol. 46: 11-21, 1960.
- JAKUBZICK C, GAUTIER EL, GIBBINGS SL, SOJKA DK, SCHLITZER A, JOHNSON TE, IVANOV S, DUAN Q, BALA S, CONDON T, VAN ROOIJEN N, GRAINGER JR, BELKAID Y, MA'AYAN A, RICHES DW, YOKOYAMA WM, GINHOUX F, HENSON PM, RANDOLPH GJ. **Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes.** Immunity. 39:599-610, 2013.
- JANNE J, ALHONEN L, PIETILA M, KEINANEN T. **Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals.** Eur J Biochem. 271:877-894, 2004.
- JENEY V, RAMOS S, BERGMAN ML, BECHMANN I, TISCHER J, FERREIRA A, OLIVEIRA-MARQUES V, JANSE CJ, REBELO S, CARDOSO S, SOARES MP. **Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide.** Cell Rep. 8:126-36, 2014.
- JENKINS SJ, HUME DA. **Homeostasis in the mononuclear phagocyte system.** Trends Immunol. 35:358-367, 2014.
- JENSEN KD, WANG Y, WOJNO ED, SHASTRI AJ, HU K, CORNEL L, BOEDEC E, ONG YC, CHIEN YH, HUNTER CA, BOOTHROYD JC, SAEIJ JP. ***Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation.** Cell Host Microbe. 9:472-483, 2011.
- JONES TC, HIRSCH JG. **The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites.** J Exp Med. 136:1173-1194, 1972.

- KANYO ZF, SCOLNICK LR, ASH DE, CHRISTIANSON DW. **Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase.** *Nature*. 383:554-557, 1996.
- KARIN M, Y BEN-NERIAH. **Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity.** *Annu Rev Immunol*. 18:621-663, 2000.
- KEELEY A, SOLDATI D. **The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa.** *Trends Cell Biol*. 14:528-532, 2004.
- KELLER R, KEIST R, IVATT RJ. **Functional and biochemical parameters of activation related to macrophage cytostatic effects on tumor cells.** *Int J Cancer*. 14:675-683,1974.
- KEMP LE, YAMAMOTO M, SOLDATI-FAVRE D. **Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites.** *FEMS Microbiol Rev*. 4:607-631, 2013.
- KESSLER H, HERM-GOTZ A, HEGGE S, RAUCH M, SOLDATIFAVRE D, FRISCHKNECHT F, MEISSNER M. **Microneme protein 8: a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*.** *J Cell Sci*. 121:947-956, 2008.
- KHALLOU-LASCHET J, VARTHAMAN A, FORNESA G, COMPAIN C, GASTON AT, CLEMENT M, DUSSIOT M, LEVILLAIN O, GRAFF-DUBOIS S, NICOLETTI A, CALIGIURI G. **Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis.** *PLoS One*. 5:1-10, 2010.
- KHAMINETS A, HUNN JP, KÖNEN-WAISMAN S, ZHAO YO, PREUKSCHAT D, COERS J, BOYLE JP, ONG YC, BOOTHROYD JC, REICHMANN G, HOWARD JC. **Coordinated loading of IRG resistance GTPases onto the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole.** *Cell Microbiol*. 12:939-961, 2010.
- KHAN IA, SCHWARTZMAN JD, MATSUURA T, KASPER LH. **A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice.** *Proc Natl Acad Sci*. 94:13955-13960, 1997.
- KHAN IA, TAYLOR S, AJIOKA JW, ROSENTHAL BM, SIBLEY LD. **Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice.** *PLoS Genet*. 5:1-14, 2009.
- KONE BC, KUNCEWICZ T, ZHANG W, YU ZY. **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*. 285:178-190, 2003.
- KONEN-WAISMAN S, HOWARD JC. **Cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii* in mouse and man.** *Microbes Infect*. 9:1652-1661, 2007.
- LABRUYERE E, LINGNAU M, MERCIER C, SIBLEY LD. **Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*.** *Mol Biochem Parasitol*. 102:311-324, 1999.
- LAMBERT H, BARRAGAN A. **Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*.** *Cell Microbiol*. 12:292-300, 2010.
- LANE C, KNIGHT D, BURGESS S, FRANKLIN P, HORAK F, LEGG J, MOELLER A, STICK S. **Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath.** *Thorax*. 59:757-760, 2004.

- LANG C, GROSS U, LÜDER CG. **Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii***. Parasitol Res. 2:191-203, 2007.
- LECORDIER L, MERCIER C, TORPIER G, TOURVIEILLE B, DARCY F, LIU JL, MAES P, TARTAR A, CAPRON A, CESBRON-DELAUW MF. **Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane**. Mol Biochem.49:143-153, 1993.
- LECORDIER L, MOLEON-BORODOWSKY I, DUBREMETZ JF, TOURVIEILLE B, MERCIER C, DESLEE D, CAPRON A, CESBRON-DELAUW MF. **Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole**. Mol Biochem Parasitol. 70:85-94, 1995.
- LECORDIER L, MERCIER C, SIBLEY LD, CESBRON-DELAUW MF. **Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell**. Mol Biol Cell. 10:1277-1287, 1999.
- LELONG B, RAHELIMINO B, CANDOLFI E, RAVELOJAONA BJ, VILLARD O, RASAMINDRAKOTROKA AJ, KIEN T. **Prevalence of toxoplasmosis in a population of pregnant women in Antananarivo (Madagascar)**. Bull Soc Pathol Exot. 88: 46-49, 1995.
- LEMGRUBER L, KLOETZEL JA, SOUZA WD, VOMMARO RC. ***Toxoplasma gondii*: further studies on the subpellicular network**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104:706-709, 2009.
- LICHANSKA AM, BROWNE CM, HENKEL GW, MURPHY KM, OSTROWSKI MC, MCKERCHER SR, MAKI RA, HUME DA. **Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1**. Blood. 94:127-138, 1999.
- LICHANSKA AM, HUME DA. **Origins and functions of phagocytes in the embryo**. Exp Hematol. 28:601-611, 2000.
- LIN X, VEENSTRA RD. **Effect of transjunctional KCl gradients on the spermine inhibition of connexin40 gap junctions**. Biophys J. 93:483-495, 2007.
- LINGELBACH K, JOINER K. **The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells**. J Cell Sci. 111:1467-1475, 1998.
- LIU K, VICTORA GD, SCHWICKERT TA, GUERMONPREZ P, MEREDITH MM, YAO K, CHU FF, RANDOLPH GJ, RUDENSKY AY, NUSSENZWEIG M. **In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis**. Science. 324:392-397, 2009.
- LOWENSTEIN CJ, PADALCO E. **iNOS (NOS2) at a glance**. J Cell Sci. 117: 2865-2867, 2004.
- MACDONALD KP, PALMER JS, CRONAU S, SEPPANEN E, OLVER S, RAFFELT NC, KUNS R, PETTIT AR, CLOUSTON A, WAINWRIGHT B, BRANSTETTER D, SMITH J, PAXTON RJ, CERRETTI DP, BONHAM L, HILL GR, HUME DA. **An antibody against the colony stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation**. Blood. 116:3955-3963, 2010.

- MACKANESS GB. **Cellular resistance to infection.** J Exp Med. 116:381-406, 1962.
- MACKANESS GB. **The monocyte in cellular immunity.** Semin Hematol. 7: 172-184, 1970.
- MAEDA H, AKAIKE T. **Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer.** Biochemistry. 63: 854-865, 1998.
- MANTEGAZZA AR, MAGALHAES JG, AMIGORENA S, MARKS MS. **Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II.** Traffic. 14:135-152, 2013.
- MARATHE C, BRADLEY MN, HONG C, LOPEZ F, RUIZ DE GALARRETA CM, TONTONOZ P, CASTRILLO A. **The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages.** J Biol Chem. 281:32197–32206, 2006.
- MARINHO CRF, NUÑEZ-APAZA LN, MARTINS-SANTOS R, BASTOS KRB, BOMBEIRO AL, BUCCI DZ, SARDINHA LR, LIMA MRD, ALVAREZ JM. **IFN $\gamma$ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites.** Scand J Immunol. 66:297-308, 2007.
- MARTIN AM, LIU T, LYNN BC, SINAI AP. **The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border.** J Eukaryot Microbiol. 54:25-28, 2007.
- MARTINEZ FO, SICA A, MANTOVANI A, LOCATI M. **Macrophage activation and polarization.** Front Biosci.13:453-461, 2008.
- MARTINEZ FO, HELMING LM, GORDON S. **Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.** Annu Rev Immunol. 27:451-483, 2009.
- MARTINEZ-RUIZ A, CADENAS S, LAMAS S. **Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms.** Free Radic Biol Med. 51:17-29, 2011.
- MASATANI T, MATSUO T, TANAKA T, TERKAWI MA, LEE EG, GOO YK, ABOGE GO, YAMAGISHI J, HAYASHI K, KAMEYAMA K, CAO S, NISHIKAWA Y, XUAN X. **TgGRA23, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the parasitophorous vacuole membrane and intravacuolar network.** Parasitol Int. 62:372-379, 2013.
- MATTILA JT, OJO OO, KEPKA-LENHART D, MARINO S, KIM JH, EUM SY, VIA LE, BARRY CE, KLEIN E, KIRSCHNER DE, MORRIS SM JR, LIN PL, FLYNN JL. **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.
- MAUELJ. **Macrophage activation and effector mechanisms against microb.** 155:675-686, 1982.
- MCCORMICK PJ, MARTINA JA, BONIFACINO JS. **Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments.** Proc Natl Acad Sci.102:7910-7915, 2005.
- MELO MB, NGUYEN QP, CORDEIRO C, HASSAN MA, YANG N, MCKELL R, ROSOWSKI EE, JULIEN L, BUTTY V, DARDÉ ML, AJZENBERG D, FITZGERALD K, YOUNG LH, SAEIJ JP. **Transcriptional Analysis of Murine Macrophages Infected with Different *Toxoplasma* Strains**

- Identifies Novel Regulation of Host Signaling Pathways.** PLOS Pathogens. 9:1-17, 2013.
- MERCIER C, DUBREMETZ JF, RAUSCHER B, LECOEDIER L, SIBLEY LD, CESBRON-DELAUW MF. **Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma parasitophorous* vacuole induced by parasite proteins.** Mol Biol Cell. 13:2397-2409, 2002.
- MERCIER C, ADJOGBLE KD, DAUBENER W, CESBRON-DELAUW MF. **Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?** Int J Parasitol. 35: 829-849, 2005.
- MERTENS C, DARNELL JE. **Snapshot: JAK-STAT signaling.** Cell. 131:612, 2007.
- METCHNIKOFF E. **Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation,** 1892.
- MICHEL T, FERON O. **Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?** J Clin Invest. 100: 2146-2152, 1997.
- MICHELIN A, BITTAME A, BORDAT Y, TRAVIER L, MERCIER C, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. **GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membraneous nanotubular network.** Int J Parasitol. 39: 299-306, 2009.
- MILDNER A, CHAPNIK E, MANOR O, YONA S, KIM KW, AYCHEK T, VAROLD, BECK G, ITZHAKI ZB, FELDMESSER E, AMIT I, HORNSTEIN E, JUNG S. **Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis.** Blood. 121:1016-1027 2013.
- MILLER SA, THATHY V, AJIOKA JW, BLACKMAN MJ, KIM K. **TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase.** Mol Microbiol. 49: 883-894, 2003.
- MILLS CD, THOMAS AC, LENZ LL, MUNDER M. **Macrophage: SHIP of Immunity.** Front Immunol. 5:1-5, 2014.
- MING XF, RAJAPAKSE AG, YEPURI G, XIONG Y, CARVAS JM, RUFFIEUX J, SCERRI I, WU Z, POPP K, LI J, SARTORI C, SCHERRER U, KWAK BR, MONTANI JP, YANG Z. **Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis.** J Am Heart Assoc. 1:1-18, 2012.
- MITAL J, MEISSNER M, SOLDATI D, WARD GE. **Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion.** Mol Biol Cell. 16: 4341-4349, 2005.
- MITCHELL GH, THOMAS AW, MARGOS G, DLUZEWSKI AR, BANNISTER LH. **Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells.** Infect Immun. 72: 154-158, 2004.
- MIYAHARA K, KAWAMOTO T, SASE K, YUI Y, TODA K, YANG LX, HATTORI R, AOYAMA T, YAMAMOTO Y, DOI Y, OGOSH S, HASHIMOTO K, KAWAI C, SASAYAMA S, SHIZUTA Y. **Cloning and structural characterization of human endothelial nitric oxide synthase gene.** Eur J Biochem. 223:719-726, 1994.

- MOLESTINA RE, EL-GUENDY N, SINAI AP. **Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle.** Cell Microbiol. 10:1153-65, 2008.
- MONTEIRO VG, SOARES CP, DE SOUZA W. **Host cell surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells.** FEMS Microbiol Lett. 164:323-327, 1998.
- MORRIS SM JR. **Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis.** Annu Rev Nutr. 12:81-101, 1992.
- MORRIS SMJR. **Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism.** Annu Rev Nutr. 22:87-105, 2002.
- MORRIS SM JR. **Arginine: beyond protein.** Am J Clin Nutr. 83:508-512, 2006.
- MORRIS SM JR. **Arginine metabolism: boundaries of our knowledge.** J Nutr. 137:1602-1609, 2007.
- MORRISSETTE NS, MURRAY JM, ROOS DS. **Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*.** J Cell Sci. 110:35-42, 1997.
- MORRISSETTE N, SIBLEY LD. **Cytoskeleton of Apicomplexa Parasites.** Microbiol Mol Biol Rev. 66:21-38, 2002.
- MOSSER DM, EDWARDS JP. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** Nat Rev Immunol. 8:958-69, 2008.
- MOSSNER J, HAMMERMANN R, RACKE K. **Concomitant down-regulation of Larginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine.** Pulm Pharmacol Ther. 14:297-305, 2001.
- MUNDER M. **Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system.** Br J Pharmacol. 158:638-51, 2009.
- MUSICKI B, ROSS AE, CHAMPION HC, BURNETT AL, BIVALACQUA TJ. **Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis.** J Androl. 30:352-362, 2009.
- MURRAY PJ. **Macrophages as a battleground for toxoplasma pathogenesis.** Cell Host Microbe. 9:445-447, 2011.
- NABIAS R, NGOUAMIZOKOU A, MIGOT-NABIAS F, MBOU-MOUTSIMBI RA, LANSOUDSOUKATE J. **Serological investigation of toxoplasmosis in patients of the M.I.P. center of Franceville (Gabon).** Bull Soc Pathol Exot. 91: 318-320, 1998.
- NAGAMUNE K, SIBLEY LD. **Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa.** Subcell Biochem. 23:1613-1627, 2006.
- NAGAMUNE K, MORENO SN, CHINI EN, SIBLEY LD. **Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites.** Subcell Biochem. 47:70-81, 2008.
- NATHAN CF, HIBBS JB. **Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity.** Curr Opin Immunol. 3:65-70, 1991.
- NELSON MM, JONES AR, CARMEN JC, SINAI AP, BURCHMORE R, WASTLING JM. **Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.** Infect Immun. 2:828-844, 2008.
- NEUDECK A, STACHELHAUS S, NISCHIK N, STRIEPEN B, REICHMANN G, FISCHER HG. **Expression variance, biochemical and immunological**

- properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7.** Microbes Infect. 4:581-590, 2002.
- NICOLLE C, MANCEAUX L. **Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi.** C R Seances Acad. Sci. 147: 763-766, 1908.
- NIEDELMAN W, GOLD DA, ROSOWSKI EE, SPROKHOLT JK, LIM D, FARID ARENAS A, MELO MB, SPOONER E, YAFFE MB, SAEIJ JPJ. **The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response.** PLoS Pathog. 8:1-16, 2012.
- NOWICKI PT, CANIANO DA, HAMMOND S, GIANNONE PJ, BESNER GE, REBER KM, NANKERVIS CA. **Endothelial nitric oxide synthase in human intestine resected for necrotizing enterocolitis.** J Pediatr. 150:40-45, 2007
- OLIVEIRA DM, SILVA-TEIXEIRA DN, GOES AM. **Evidence for nitric oxide action on in vitro granuloma formation through pivotal changes in MIP-1 alpha and IL-10 release in human schistosomiasis.** Nitric Oxide. 3:162-171, 1999.
- OUZOUNIS CA, KYRPIDES NC. **On the evolution of arginases and related enzymes.** J Mol Evol. 31:104-109, 1994.
- OSSORIO PN, DUBREMETZ JF, JOINER KA. **A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interaction.** J Biol Chem. 269:15350-15357, 1994.
- OTTAVIANI E, MALAGOLI D, GRIMALDI A, DE EGUILEOR M. **The case of the “serfdom” condition of phagocytic immune cells.** Invert Surv J. 9:134-138, 2012.
- PADRÃO JD, CABRAL GR, DA SILVA MD, SEABRA SH, DAMATTA RA. ***Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway.** Parasitol Int. 63:659-663, 2014.
- PANTALONE R, PAGE RC. **Enzyme production and secretion by lymphokine-activated macrophages.** J Reticuloendothel Soc. 21:343-357, 1977.
- PAPPAS G, ROUSSOS N, FALAGAS ME. **Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis.** Int J Parasitol. 12:1385-1394, 2009.
- PAREDES-SANTOS TC, DE SOUZA W, ATTIAS M. **Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*.** J Struct Biol. 177:420-430, 2012.
- PEAPER DR, CRESSWELL P. **Regulation of MHC class I assembly and peptide binding.** Annu Rev Cell Dev Biol. 24:343-368, 2008.
- PEARCE EJ, LA FLAMME A, SABIN E, ROSA BRUNET L. **The initiation and function of Th2 responses during infection with *Schistosoma mansoni*.** Adv Exp Med Biol. 452:67-73, 1998.
- PEGG AE. **Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy.** Cancer Res. 48:759-774, 1988.
- PEGG AE. **Mammalian polyamine metabolism and function.** IUBMB Life. 61:880-94, 2009.

- PROELLOCKS NI, COPPEL RL, WALLER KL. **Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins.** Trends Parasitol. 26: 297-304, 2010.
- PSZENNY V, LEDESMA BE, MATRAJT M, DUSCHAK VG, BONTEMPI EJ, DUBREMETZ JF, ANGEL SO. **Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*.** Mol Biochem Parasitol. 121:283-286, 2002.
- QUINTON LJ, MIZGERD JP. **NF-kappaB and STAT3 signaling hubs for lung innate immunity.** Cell Tissue Res. 343:153-165, 2011.
- RAWAL BD. **Toxoplasmosis. A dye-test on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay.** Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 53: 61-63, 1959.
- REDDIEN PW, HORVITZ HR. **The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*.** Annu Rev Cell Dev Biol. 20:193-221, 2004.
- ROME ME, BECK JR, TURETZKY JM, WEBSTER P, BRADLEY PJ. **Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*.** Infect Immun. 76:4865-4875, 2008.
- SAEIJ JP, BOYLE JP, COLLIER S, TAYLOR S, SIBLEY LD, BROOKE-POWELL ET, AJIOKA JW & BOOTHROYD JC. **Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis.** Science. 314:1780-1783, 2006.
- SAEIJ JP, COLLIER S, BOYLE JP, JEROME ME, WHITE MW & BOOTHROYD JC. **Toxoplasma-co-opted host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue.** Nature. 445:324-327, 2007.
- SANTHANAM L, LIM HK, LIM HK, MIRIEL V, BROWN T, PATEL M, BALANSON S, RYOO S, ANDERSON M, IRANI K, KHANDAY F, DI COSTANZO L, NYHAN D, HARE JM, CHRISTIANSON DW, RIVERS R, SHOUKAS A, BERKOWITZ DE. **Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction.** Circ Res. 101:692-702, 2007.
- SARKAR T, PETROV AS, VITKO JR, SANTAI CT, HARVEY SC, MUKERJI I, HUD NV. **Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin.** Biochemistry. 48:667-675, 2009.
- SCAGLIA F, BRUNETTI-PIERRI N, KLEPPE S, MARINI J, CARTER S, GARLICK P, JAHOR F, O'BRIEN W, LEE B. **Clinical consequences of urea cycle enzyme deficiencies and potential links to arginine and nitric oxide metabolism.** J Nutr. 134:2796-2797, 2004.
- SCHARTON-KERSTEN TM, YAP G, MAGRAM J, SHER A. **Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*.** J Exp Med. 185:1261-1273, 1997.
- SCHULZ C, GOMEZ PERDIGUERO E, CHORRO L, SZABO-ROGERS H, CAGNARD N, KIERDORF K, PRINZ M, WU B, JACOBSEN SE, POLLARD JW, FRAMPTON J, LIU KJ, GEISSMANN F. **A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.** Science. 336:86-90, 2012.
- SEABRA SH, DE SOUZA W, DAMATTA RA. ***Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages.** Exp Parasitol. 100:62-70, 2002.

- SEABRA SH, DAMATTA RA, DE SOUZA W. ***Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- $\beta$ 1 autocrine effect orchestrating macrophages evasion.** Biochem Biophys Res Commun. 324:744-752, 2004.
- SEKOWSKA A, DANCHIN A, RISLER JL. **Phylogeny of related functions: the case of polyamine biosynthetic enzymes.** Microbiology.146:1815-1828, 2000.
- SERBINA NV, SALAZAR-MATHER TP, BIRON CA, KUZIEL WA, PAMER EG. **TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection.** Immunity. 19:59-70, 2003.
- SERBINA NV, PAMER EG. **Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2.** Nat Immunol. 7:311-317, 2006.
- SERHAN CN, YANG R, MARTINOD K, KASUGA K, PILLAI PS, PORTER TF, OH SF, SPITE M. **Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions.** J Exp Med. 206:15-23, 2009.
- SHANTZ LM, LEVIN VA. **Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential.** Amino Acids. 33:213-223, 2007.
- SIBLEY LD, NIESMAN IR, PARMLEY SF, CESBRON-DELAUW MF. **Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to the formation of a tubulo-vesicular network in host cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*.** J Cell Sci. 108:1669-1677, 1995.
- SIBLEY DL, CHARRON A, HÅKANSSON S, DANA M. **Invasion and Intracellular Survival by *Toxoplasma*.** In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
- SIBLEY LD. ***Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style.** Traffic. 4:581-586, 2003.
- SICA A, BRONTE V. **ALTERED MACROPHAGE DIFFERENTIATION AND IMMUNE DYSFUNCTION IN TUMOR DEVELOPMENT.** J Clin Invest. 117:1155-1166, 2007.
- SILVERMAN N, MANIATIS T. **NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity.** Genes Dev.15: 2321-2342, 2001.
- SINAI AP, JOINER KA. **Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles.** Annu Rev Microbiol. 51:415-462, 1997.
- SINAI AP, WEBSTER P, JOINER KA. **Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction.** Journal of Cell Science.110: 2117-2128, 1997.
- SINAI AP, JOINER KA. **The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane.** J Cell Biol. 154:95-108, 2001.
- SINGH S, ALAM MM, PAL-BHOWMICK I, BRZOSTOWSKI JA, CHITNIS CE. **Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites.** PLoS Pathog. 6:1-14, 2010.
- SOSA RM, DAVID JR, BOJALIL R, SATOSKAR AR, TERRAZAS LI. **Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling.** J Immunol. 168: 3135-3139, 2002.

- SPARKES RS, DIZIKES GJ, KLISAK I, GRODY WW, MOHANDAS T, HEINZMANN C, ZOLLMAN S, LUSIS AJ, CEDERBAUM SD. **The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23.** Am J Hum Genet. 39:186-193, 1986.
- SPLENDRE A. **Um nuovo protozoa parassita de' conigli, 4. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo.** Nota preliminare pel. Rev Soc Scien São Paulo. 3:109-112, 1908.
- STEINFELDT T, KOENEN-WAISMAN S, TONG L, PAWLOWSKI N, LAMKEMEYER T, SIBLEY LD, HUNN JP, HOWARD JC. **Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*.** PLoS Biol. 8: 1-14, 2010.
- STEINMAN RM, WITMER MD, NUSSENZWEIG MC, CHEN LL, SCHLESINGER S, COHN ZA. **Dendritic cells of the mouse: identification and characterization.** J Invest Dermatol. 75:14-16, 1980.
- STUEHR D, POU S, ROSEN GM. **Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.** J Biol Chem. 276:14533-14536, 2001.
- SWIRSKI FK, NAHRENDORF M, ETZRODT M, WILDGRUBER M, CORTEZ-RETAMOZO V, PANIZZI P, FIGUEIREDO JL, KOHLER RH, CHUDNOVSKIY A, WATERMAN P, AIKAWA E, MEMPEL TR, LIBBY P, WEISSLEDER R, PITTET MJ. **Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites.** Science. 325:612-616, 2009.
- STRAUB KW, CHENG SJ, SOHN CS, BRADLEY PJ. **Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements.** Cell Microbiol. 11:590-603, 2009.
- TAYLOR S, BARRAGAN A, SU C, FUX B, FENTRESS SJ, TANG K, BEATTY WL, HAJJ HE, JEROME M, BEHNKE MS, WHITE M, WOOTTON JC, SIBLEY LD. **A secreted serinethreonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*.** Science. 314:1776-1780, 2006.
- TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM. ***Toxoplasma gondii*: from animal to humans.** Int J Parasitol. 30: 1217-1258, 2000.
- THOMAS DD, RIDNOUR LA, ISENBERG JS, FLORES-SANTANA W, SWITZER CH, DONZELLI S, HUSSAIN P, VECOLI C, PAOLOCCI N, AMBS S, COLTON CA, HARRIS CC, ROBERTS DD, WINK DA. **The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling.** Free Rad Biol Med. 45:18-31, 2008.
- TOPAL G, BRUNET A, WALCH L, BOUCHER JL, DAVIDDUFILHO M. **Mitochondrial arginase II modulates nitric oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells.** J Pharmacol Exp Ther. 318:1368-1374:2006.
- TYLER JS, BOOTHROYD JC. **The C-terminus of *Toxoplasma* RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex.** PLoS Pathog. 7:1-12, 2011.
- UTHAIAH RC, PRAEFCKE GJ, HOWARD JC, HERRMANN C. **IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization.** J Biol Chem. 278:29336-29343, 2003.

- VALLABHAPURAPU S, KARIN M. **Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system.** *Annu Rev Immunol.* 27:693-733, 2009.
- VAN FURTH R, SLUITER W. **Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool.** *J Exp Med.* 163:474-479, 1986.
- VENEMA RC. **Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin.** *Int Immunopharmacol.* 2:1755-1762, 2002.
- VINH DC, PATEL SY, UZEL G, ANDERSON VL, FREEMAN AF, OLIVIER KN, SPALDING C, HUGHES S, PITTALUGA S, RAFFELD M, SORBARA LR, ELLOUMI HZ, KUHNS DB, TURNER ML, COWEN EW, FINK D, LONG-PRIEL D, HSU AP, DING L, PAULSON ML, WHITNEY AR, SAMPAIO EP, FRUCHT DM, DELEO FR, HOLLAND SM. **Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia.** *Blood.* 115:1519-1529, 2010.
- WATTS C. **Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.** *Annu Rev Immunol.* 15:821-850, 1997.
- WEINMAN D, CHANDLER AH. **Toxoplasmosis in swine and rodents reciprocal oral infection and potential human hazard.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 87: 211-216, 1954.
- WILLIAMS MJ. **Drosophila hemopoiesis and cellular immunity.** *J Immunol.* 178:4711-4716, 2007.
- WONG KL, TAI JJ, WONG WC, HAN H, SEM X, YEAP WH, KOURILSKY P, WONG SC. **Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets.** *Blood.* 118:e16-e31, 2011.
- WOODS S, SCHROEDER J, MCGACHY HA, PLEVIN R, ROBERTS CW, ALEXANDER J. **MAP kinase phosphatase-2 plays a key role in the control of infection with *Toxoplasma gondii* by modulating iNOS and arginase-1 activities in mice.** *PLoS Pathog.* 9:1-13, 2013.
- WU G, MORRIS SM JR. **Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.** *Biochem J.* 336:1-17, 1998.
- WU H, MIN J, ZENG H, MCCLOSKEY DE, IKEGUCHI Y, LOPPNAU P, MICHAEL AJ, PEGG AE, PLOTNIKOV AN. **Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism.** *J Biol Chem.* 283:16135-16146, 2008.
- YAP GS, SHER A. **Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.** *J Exp Med.* 189:1083-1092, 1999.
- YEWDELL JW. **DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing.** *Trends in immunology.* 32:548-558, 2011.
- YONA S, KIM KW, WOLF Y, MILDNER A, VAROL D, BREKER M, STRAUSS-AYALI D, VIUKOV S, GUILLIAMS M, MISHARIN A, HUME DA, PERLMAN H, MALISSEN B, ZELZER E, JUNG S. **Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis.** *Immunity.* 38:79-91, 2013.
- ZAOBORNYY T, GHAFOURIFAR P. **Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 303:1283-1293, 2012.

- ZHANG M, CARAGINE T, WANG H, COHEN PS, BOTCHKINA G, SODA K, BIANCHI M, ULRICH P, CERAMI A, SHERRY B, TRACEY KJ. **Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response.** J Exp Med. 185:1759-1768, 1997.
- ZHAO Y, FERGUSON DJ, WILSON DC, HOWARD JC, SIBLEY LD, YAP GS. **Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages.** J Immunol. 182:3775-3781, 2009.
- ZHAO YO, KHAMINETS A, HUNN JP, HOWARD JC. **Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN gamma inducible immunity related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death.** PLoS Pathog. 5:1-17, 2009.
- ZHAO YO, ROHDE C, LILUE JT, KÖNEN-WAISMAN S, KHAMINETS A, HUNN JP, HOWARD JC. ***Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 104:234-240, 2009.
- ZIEGLER-HEITBROCK L, ANCUA P, CROWE S, DALOD M, GRAU V, HART DN, LEENEN PJ, LIU YJ, MACPHERSON G, RANDOLPH GJ, SCHERBERICH J, SCHMITZ J, SHORTMAN K, SOZZANI S, STROBL H, ZEMBALA M, AUSTYN JM, LUTZ MB. **Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.** Blood. 116:1-8, 2010.
- ZIEGLER-HEITBROCK L, HOFER TP. **Toward a refined definition of monocyte subsets.** Front Immunol. 4:1-5, 2013.
- ZIMMERMANN S, MURRAY PJ, HEEG K, DALPKE AH. **Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling.** J Immunol. 176:1840-1847, 2006.