

INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS
INFECTADOS POR *TOXOPLASMA GONDII*: VIAS DE
DEGRADAÇÃO DA ÓXIDO NITRICO SINTASE INDUZIDA E
FORMAÇÃO DE AGROSSOMO

JULIANA DA CRUZ PADRÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

JUNHO DE 2014

INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS
INFECTADOS POR *TOXOPLASMA GONDII*: VIAS DE
DEGRADAÇÃO DA ÓXIDO NITRICO SINTASE INDUZIDA E
FORMAÇÃO DE AGROSSOMO

JULIANA DA CRUZ PADRÃO

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Biociências e Biotecnologia
com ênfase em Biologia Celular.

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

JUNHO DE 2014

INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS
INFECTADOS POR *TOXOPLASMA GONDII*: VIAS DE
DEGRADAÇÃO DA ÓXIDO NITRICO SINTASE INDUZIDA E
FORMAÇÃO DE AGROSSOMO

JULIANA DA CRUZ PADRÃO

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Biociências e Biotecnologia
com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 11 de junho de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof^a Alba Lucínia Peixoto. Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia) –
UENF

Prof^a Lílian Maria Garcia Bahia. de Oliveira (Doutora em Ciências) – UENF

Prof. Francisco José Rocha de Souza (Doutor em Ciências Biológicas) – UEZO

Prof. Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências) – UENF

(Orientador)

Dedico esta tese

Aos meus filhos, Maria Clara e Davi, como material que mostre para eles, através do exemplo, que um sonho pode ser conquistado quando se coloca Deus como Pai, Mestre, Instrutor, Direcionador e o Realizador deste sonho.

E ao meu marido que construiu este sonho junto comigo.

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te esforço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”

Isaias, 41: 10

AGRADECIMENTOS

1. Agradeço a Deus por ter me sustentado e conduzido, por ter me inspirado e protegido e que toda honra e glória seja dada a Ele.
2. Agradeço ao meu marido Pedro pela presença e participação, amor e dedicação comigo e com nossos filhos quando estava ausente.
3. Agradeço aos meus filhos Maria Clara e Davi pela compreensão na minha ausência e pelo carinho.
4. Agradeço aos meus pais Rui e Martha, minha base e exemplo, pelo incentivo e orações.
5. Agradeço a minha irmã Manuella pela sua presença sempre doce e amiga mesmo quando distante.
6. Agradeço ao meu cunhado Peter e sua parentela pelo incentivo e orações.
7. Agradeço ao Pastor e amigo Maycon Madeiras pela minha condução, ensinamentos e orações.
8. Agradeço ao meu orientador Prof. Renato, que me acolheu desde a iniciação científica como um pai, minha admiração e respeito.
9. Agradeço a minha amiga Laura que esteve presente de forma carinhosa, sincera e incentivadora. E a todos os colegas de bancada pela convivência agradável, em especial a Gabriel pela ajuda nos experimentos deste trabalho.
10. Agradeço a todos os técnicos e professores, pelos ensinamentos e contribuições, em especial, Zila, Danielle Seipel, Marlene, Bia, Prof^a. Olga e Prof^a. Kátia.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas.....	IX
Lista de figuras, tabelas.....	XI
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográfica.....	1
2.1 iNOS.....	1
2.1.1 Estrutura e função.....	1
2.1.2 Atividade	4
2.1.3 Regulação da atividade.....	6
2.2 Degradação da iNOS.....	11
2.2.1 Proteossomo.....	11
2.2.2 Calpaína.....	13
2.2.3 Lisossomo	14
2.2.4 Agrossomo.....	17
2.3 iNOS na infecção.....	19
2.3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2.3.2 Macrófagos.....	28
2.3.3 Interação entre macrófagos e <i>Toxoplasma gondii</i>	31
3 Justificativa.....	32
4 Objetivos.....	33
5 Material e Métodos.....	34
5.1 Macrófago.....	34
5.2 Obtenção de <i>T. gondii</i>	34
5.3 Interação de <i>T. gondii</i> com Macrófagos J774-A1.....	34
5.4 Tratamento com lactocistina, Calpeptina ou Concanamicina A.....	34
5.5 Marcação de compartimentos ácidos e viabilidade celular por fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio.....	34
5.6 Expressão da iNOS e ubiquitina reveladas por imunofluorescência.....	35
5.7 Detecção da iNOS por Western blot.....	35
5.8 Avaliação de nitrito.....	36
5.9 Identificação do agressomo de iNOS após inibição do proteossomo em macrófagos ativados e infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	36
5.10 Teste estatístico.....	36
6 Resultados.....	37
7 Discussão.....	47
8 Conclusão.....	55
9 Referências bibliográficas.....	56

Lista de siglas e abreviaturas

- AIDS/SIDA: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
- ARG: Arginina
- BH₄: Tetrahidrobiopterina
- BSA: Albumina Sérica Bovina
- CaM: Calmodulina
- CD14: *Cluster of differentiation* 14, sistema CD de nomenclatura que identifica moléculas de superfície
- CHIP: Proteína de interação da terminação carbox da Hsp 70
- DC: Células Dendríticas
- DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo
- FMN – Flavina Mononucleotídeo
- GM-CSF: Fator estimulador de colônia macrófago-granulócito
- H: Heme
- HMGI (Y): Grupo de proteínas de alta mobilidade, isoformas I e Y
- IFNR1: Receptor de Interferon 1
- IFNR2: Receptor de Interferon 2
- IFN- γ : Interferona-gamma
- IgG: Imunoglobulina G
- IL- 2: Interleucina 2
- IL- 4: Interleucina 4
- IL-6: Interleucina 6
- IL- 10: Interleucina 10
- IL-12: Interleucina 12
- IL-13: Interleucina 13
- iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida
- Jak: Janus Quinase
- LBP: Proteína Ligadora de LPS
- LPS: Lipopolissacarídeo
- MAF: Fator de Ativação de Macrófago

- MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
- MD-2: Fator de Diferenciação de Mielóide-2
- MG-132: N-carbobenzoxyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal
- MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MØ: Macrófago
- NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P
- NF-κB: Fator de transcrição nuclear
- NK: Células Matadoras Naturais
- NO: Óxido Nítrico
- OPN: Osteopontina
- PBS: Solução salina tamponada de fosfato
- PS: Fosfatidilserina
- ROP16: Proteína da rópria 16
- SFB: Soro Fetal Bovino
- STAT: *Signal transducers and activators of transcription*
- TGF-β: Fator transformador de crescimento-β
- Th1: subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4+
- TLR-4: Receptor Toll-like 4
- TNF-α: Fator de Necrose Tumoral α
- Trp: Triptofano
- VP: Vacúolo Parasitóforo

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Síntese de óxido nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase (NOS). NOS produz NO e L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina e a reação tem como intermediário N-hidroxi-L-arginina. Fonte: Sempombe *et al.* (2011). **Página 2.**

Figura 2: Estrutura do monômero da óxido nítrico sintase induzida. Os sítios de ligação de L-arginina (ARG), Heme (H), Tetrahydrobiopterina (BH^4), Calmodulina (CaM), Flavina Mononucleotídeo (FMN), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) estão indicados. Fonte: modificado de Kone *et al.* (2003). **Página 3.**

Figura 3: Importância da dimerização para completar a transferência de elétrons na óxido nítrico sintase induzida (iNOS). No dímero de iNOS, cada domínio redutase transfere elétrons (setas) da NADPH via FMN para o heme do domínio oxidase. L-arginina (ARG), heme (Fe), tetrahydrobiopterina (H_4B), Calmodulina (CAM), Flavina Mononucleotídeo (FMN), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH). Fonte: Siddhanta *et al.* (1998). **Página 4.**

Figura 4: Regulação da heme pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Modelo da função do GAPDH na inserção do heme (H) na iNOS e sua regulação por S-nitrosilação. GAPDH se liga a heme e interage com apo-iNOS nas células. Esse processo envolve HSP90. O monômero ligado ao heme então dimeriza e se liga ao cofator H_4B para formar uma iNOS ativa que pode sintetizar NO a partir de arginina (Arg). O NO produzido faz com que GAPDH se transforme em SNO-GAPDH, por um processo de nitrosilação e SNO-GAPDH inibe a inserção de heme na iNOS. A formação de SNO-GAPDH pode ser inibida farmacologicamente por deprenyl, permitindo a inserção de heme à iNOS, produzindo mais NO. Fonte: Chakravarti *et al.* (2010). **Página 9.**

Figura 5: Modelo cinético de síntese de NO pela iNOS envolvendo o Fe do grupamento heme. A redução do estado do ferro do grupamento heme de férrico para ferroso (Kr) permite a ligação do O_2 e início das reações catalíticas. O produto intermediário, complexo NO heme férrico ($Fe^{III}NO$) é gerado, podendo liberar o NO (Kd) (Ciclo produtivo) ou ser reduzido (Kr') para o complexo NO heme ferroso ($Fe^{II}NO$). Este complexo dissocia-se lentamente produzindo NO_3^- e a forma férrica através da enzima Kox (Ciclo fútil). Fonte: Wang (2012). **Página 10.**

Figura 6: Subunidade 26 do proteossomo. Proteossomo, 26S, esquematizado mostrando suas subunidades, 20S responsável pela atividade catalítica e 19S que é a subunidade regulatória. Fonte: Modificado de Ciechanover (2005). **Página 12.**

Figura 7: Estrutura cristalográfica da m-Calpaína humana. Os domínios da proteína aparecem em cores diferentes (STROBL *et al.*, 2000). **Página 14.**

Figura 8: Mecanismos de proteólise mediados pelos lisossomos. Endocitose mediada por receptor; pinocitose; fagocitose e autofagia. Modificado de Ciechanover (2005). **Página 16.**

Figura 9: Função da proteína CHIP na degradação da iNOS via proteossomo e formação do agressomo com inibição do proteossomo. CHIP recruta proteína 70 de choque térmico

(HSP) e a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que realiza a ubiquitinação da iNOS. A iNOS é ubiquitinada ficando “marcada” para degradação no proteossomo. Caso o proteossomo seja inibido, o complexo CHIP-HSP-iNOS ubiquitinada se ligam a *Histone DeAcetylase 6* (HDAC6) que conecta com a dineína transportando o complexo via microtúbulo que acumula no centro celular definindo o “agressomo da iNOS”. Esse agressomo é degradado posteriormente por macroautofagia. Modificado de Sha *et al.* (2009). **Página 18.**

Figura 10: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Parasita em seus vários hospedeiros, formas, e seu mecanismo de transmissão (Fonte: Dissertação de Miriam de Souza Macre, USP, 2002). **Página 21.**

Figura 11: Organelas. Desenho esquemático baseado em micrografia eletrônica mostrando as organelas de taquizoítos (esquerda) e bradizoítos (direita) de *Toxoplasma gondii*. (Modificado de DUBEY *et al.* 1998). **Página 23.**

Figura 12: Representação esquemática dos mecanismos efetores regulatório e anti-parasítico durante a infecção com *Toxoplasma gondii*. DC: células dendríticas, NK: células matadoras naturais, NO: óxido nítrico, Trp: triptofano. Fonte: LANG *et al.*, 2007). **Página 24.**

Figura 13: Processo de maturação e ativação de macrófagos. Desenho mostrando maturação da monócito na medula óssea, sua circulação no sangue e sua diferenciação em macrófagos quando estão em tecidos. No tecido inflamado este macrófago está ativado. (Modificado de ADAMS, 1994). **Página 28.**

Figura 14. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados (+) ou não (-) com Lactocistina. Macrófagos tratados com lactocistina continuam a produzir NO mesmo infectados com *Toxoplasma gondii*. n=3, * Significativamente diferente (P <0,05). **Página 38.**

Figura 15. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados (+) ou não (-) com Calpeptina. Macrófagos tratados com calpeptina diminuem a produção de NO assim como os não tratados na infecção por *Toxoplasma gondii*. n=3, * Significativamente diferente (P <0,05). **Página 39.**

Figura 16. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados (+) ou não (-) com Concanamicina A. Macrófagos tratados com concanamicina A diminuem a produção de NO assim como os não tratados na infecção por *Toxoplasma gondii*. n=3, * Significativamente diferente (P <0,05). **Página 40.**

Figura 17. Expressão da iNOS (verde), localização de parasitas (vermelho) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com lactocistina. A: MØ ativados, 2h. B: MØ ativado e infectado com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS reduzida. C: MØ ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS é mantida. D: MØ ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T.gondii* por 6 horas, expressão da iNOS foi mantida e acumulada na região perinuclear. **Página 41.**

Figura 18. Expressão iNOS (verde), localização de parasitas (vermelho) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com

calpeptina. A: MØ ativados, 2h. B: MØ ativado e infectado com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS reduzida. C: MØ ativados, tratados com calpeptina e infectados com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS é reduzida. D: MØ ativados, tratados com calpeptina e infectados com *T.gondii* por 6 horas, expressão da iNOS permanece reduzida. Barra: 10µm.

Página 42.

Figura 19. Expressão iNOS (verde), localização de parasitas (vermelho) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com concanamicina. A: MØ ativados, 2h. B: MØ ativado e infectado com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS reduzida. C: MØ ativados, tratados com concanamicina e infectados com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS é reduzida. D: MØ ativados, tratados com concanamicina e infectados com *T.gondii* por 6 horas, expressão da iNOS permanece reduzida. Barra: 10µm. **Página 43.**

Figura 20. Expressão da iNOS. A: Detecção da óxido nítrico sintase induzida em cultura de macrófagos em diferentes situações por 6h. 1: Macrófagos ativado (controle); 2: Macrófago ativado e infectado com *Toxoplasma gondii* 6h; 3: Macrófago ativado, tratado com lactocistina e infectado com *T. gondii*, 4: Macrófago ativado, tratado com calpeptina e infectado com *T. gondii*. A.a.: Densitometria óptica da fig. A; n=3. **Página 44.**

Figura 21. Agrossomo (seta). Macrófago ativado, tratado com inibidor de proteossomo, lactocistina, e infectado com *T. gondii* por 6 h. **Página 45.**

Figura 22: Expressão iNOS (verde), ubiquitina (vermelho), localização de parasitas (DIC - seta) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados por 2 h com *Toxoplasma gondii* e tratados com lactocistina. A, B, C: MØ ativados, alta expressão da iNOS e baixa da ubiquitina. D, E, F, G: MØ ativado e infectado com *T. gondii* por 2h, iNOS ubiquitinada. H, I, J, K: MØ ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T. gondii* por 2h, iNOS ubiquitinada. L, M, N, O: MØ ativados, tratados com lactocistina por 2h, iNOS ubiquitinada. **Página 46.**

Figura 23: Modelo de experimentação para detectar a via de degradação da iNOS. **Página 49.**

Figura 24: Esquema resultados obtidos, mostrando que a iNOS permanece ativa no tratamento com lactocistina, que é quando o proteossomo está inativo. **Página 54.**

Tabela 1: Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados e residentes infectados ou não com *Toxoplasma gondii*. **Página 37.**

RESUMO

O macrófago peritoneal de camundongo quando ativado com LPS e IFN- γ produz NO, um agente microbicida. Esta reação tem arginina como substrato produzindo NO e citrulina e é catalisada pela iNOS. No entanto, tem sido demonstrado que a produção de NO é inibida pela infecção de *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose. Esta inibição é causada pelo desaparecimento da iNOS. Três vias de degradação da iNOS foram descritas, através da ação de: 1) proteossomo, 2) calpaína, ou 3) lisossomo. O objetivo deste trabalho foi de identificar a via de degradação da iNOS após a infecção de macrófagos ativados por *T. gondii*. Para tal a linhagem de macrófagos J774-A1 foi cultivada em garrafas com meio de cultura DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). *Toxoplasma gondii*, cepa RH, foi mantido por passagens, na cavidade peritoneal de camundongos Swiss. Para as infecções, macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços ou placas de Petri com DMEM com 5% de SFB e ativados com LPS e IFN- γ 24h antes das interações. Os macrófagos foram tratados com lactocistina (inibidor do proteossomo); com calpeptina (inibidor da calpaína); ou com concanamomicina A (inibidor de lisossomo) por 1h após o plaqueamento e a interação foi realizada com 10 parasitas por macrófago. As células e o sobrenadante da cultura foram coletados 2, 6 e 24h após a infecção para a dosagem de NO através da técnica de Griess e expressão de iNOS por imunofluorescência e western blotting. Macrófagos infectados tratados com lactocistina (via de degradação pelo proteossomo inativada) apresentaram expressão da enzima iNOS no citoplasma maior que macrófagos infectados não tratados, e a iNOS foi ubiquitinada antes de sua degradação nesses macrófagos infectados. Macrófagos infectados tratados com calpeptina (via das calpaínas inativada) e concanamomicina A (via do lisossomo inativada) produzem menos NO que macrófagos não infectados, assim como os infectados não tratados. Há formação de agrossomo de iNOS em macrófagos infectados e tratados com lactocistina. Conclui-se que o mecanismo de degradação da iNOS em macrófagos infectados por *T. gondii* é pela via do proteossomo.

Palavras chaves: Macrófago, *Toxoplasma gondii*, Óxido Nítrico Sintase Induzida, Proteossomo, Calpaína, Lisossomo.

ABSTRACT

Activated macrophages produce nitric oxide (NO), which is a microbicidal agent. This production is catalyzed by inducible NO synthase (iNOS), which uses arginine as substrate producing NO and citrulline. It has been demonstrated that NO production is inhibited by *Toxoplasma gondii* infection, the agent of toxoplasmosis. This escape mechanism is directly related with parasite active invasion. This inhibition is caused by iNOS disappearance of only infected macrophages. Three main iNOS degradation pathways have been described: the proteasome, the calpain and the lysosome pathway. This work aims the identification of the iNOS degradation pathway caused by *T. gondii* infection of activated macrophages. For this, J774-A1 macrophage cell line was cultured with Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 5 % fetal bovine serum. *Toxoplasma gondii* (RH strain) was maintained by peritoneal passages in Swiss mice. Macrophages were activated with lipopolysaccharide and Interferon-gamma for 24h, treated with lactacystine β lactone (proteasome inhibitor), calpeptine (calpain inhibitor), or concanamycin A (lysosome inhibitor) and infected with the parasite. Cells on coverslips and supernatant were collected after 2, 6 and 24h to assay iNOS expression by immunofluorescence and western blotting and NO production by the Griess reagent. iNOS was not visualized in macrophages infected with *T. gondii*. Macrophages treated with lactacystine infected with *T. gondii* showed iNOS expression. However, calpeptin and concanamycin A treatments could not revert NO inhibition. There is iNOS agrosome formation at infected macrophages treated with lactacystim. These results indicate that *T. gondii* infection activates the proteasome pathway degrading iNOS.

Keywords: inducible Nitric Oxide Synthase, *Toxoplasma gondii*, macrophage, lysosome, calpain, proteasome.

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente da toxoplasmose, uma doença disseminada em todo o mundo (Petersen, 2007). Macrófagos ativados classicamente controlam *T. gondii* pela produção de óxido nítrico (NO) (Adams *et al.*, 1990). Este agente microbicida é produzido pela NO sintase induzida (iNOS) (Kone *et al.*, 2003). No entanto, tem sido descrito que a infecção de *T. gondii* causa inibição da produção de NO em macrófagos de camundongos (DaMatta *et al.*, 2000; Seabra *et al.*, 2002, 2004, Santos *et al.*, 2011) ou em linhagens de células de galinha (Guilhermo *et al.*, 1998). A inibição da produção de NO causada pela infecção por *T. gondii* ocorre porque a iNOS é degradada (Guilhermo *et al.*, 1998; Seabra *et al.*, 2002, 2004). iNOS é naturalmente regulada por três possíveis vias de degradação: proteossomo (Kone *et al.*, 2003; Musial *et al.*, 2001), calpaína (Kone *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 1997) e lisossomo (Musial *et al.*, 2001). O objetivo deste trabalho foi determinar se essas três vias estão envolvidas na degradação da iNOS depois da infecção por *T. gondii*. Nós mostramos que a inibição da via do proteossomo por lactocistina não permite a degradação da iNOS após infecção por *T. gondii* em macrófagos J774A1 ativados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 iNOS

2.1.1 Estrutura e função

Oxido nítrico sintase (NOS) é uma enzima que catalisa reações de produção do gás NO (**Figura 1**), um radical livre que tem capacidade de se difundir através de membranas biológicas, sendo um sinalizador molecular e agente microbicida (Adams *et al.*, 1990). NO foi identificado e descrito em 1989 e a importância do seu estudo foi reconhecida em 1998 com o prêmio Nobel para pesquisadores que o descobriram como mediador biológico (Knowles & Moncada, 1994).

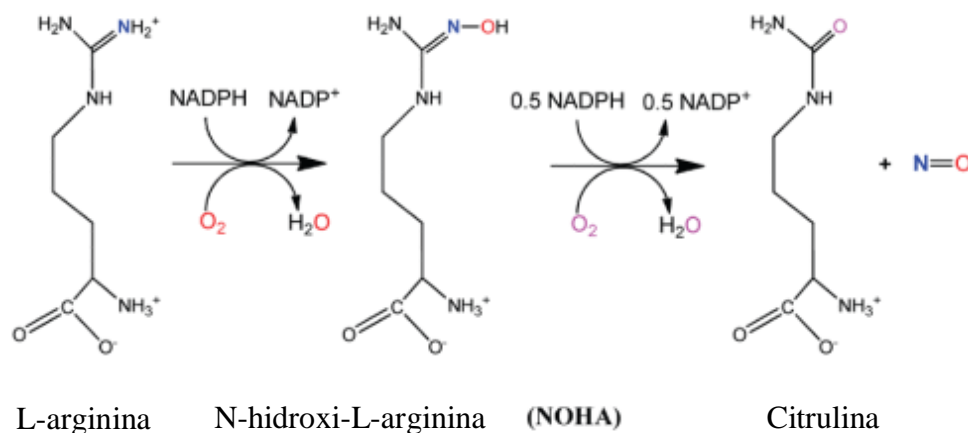


Figura 1: Síntese de óxido nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase (NOS). NOS produz NO e L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina e a reação tem como intermediário N-hidroxi-L-arginina. Fonte: Sempombe *et al.* (2011).

Existem três principais isoformas de NOS em mamíferos que apresentam 51 a 57% de similaridade com as isoformas humanas (Alderton *et al.*, 2001): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). A eNOS e a nNOS são constitutivas. iNOS, também conhecida como tipo II, NOS II e NOS 2, é uma enzima expressa em situações pro-inflamatórias gerando grandes quantidades de NO que funciona como agente microbicida contra patógenos (Adams *et al.*, 1990). No entanto, o NO produzido pode causar destruição tecidual gerando doenças inflamatórias (Pandit *et al.*, 2009). Ademais, alguns protozoários patogênicos são adaptados ao sistema imunológico de vertebrados e conseguem burlar esse sistema microbicida reduzindo a expressão da iNOS (Seabra *et al.*, 2002; Guillermo & DaMatta, 2004; DaMatta *et al.*, 2007). Portanto, saber como a iNOS é regulada pelo controle de sua estrutura e síntese catalítica, transcrição, degradação e moléculas inibidoras é importante para entender sua função na resposta imunológica, mecanismo de evasão de patógenos, e fundamental para a busca de novas terapias para doenças inflamatórias infecciosas ou não.

A iNOS foi originalmente purificada e clonada de macrófagos ativados, e tem sido identificada em inúmeros tecidos de mamíferos (Michel & Feron, 1997), em poucas espécies de bactérias gram positivas (Sudhamsu & Crane, 2009) e alguns fungos (Messner *et al.*, 2009).

A iNOS é expressa constitutivamente somente em alguns tecidos específicos como epitélio do íleo murino, epitélio brônquico, bronquíolos de

destruição intracelular de patógenos (Kuang *et al.*, 2010). O NO funciona como sinalizador e agente microbicida produzido por macrófagos ativados a partir do aminoácido L-Arginina. O NO interage com muitas vias metabólicas requeridas para sobrevivência do patógeno, e pode paradoxalmente causar danos ao tecido hospedeiro (Macmicking *et al.*, 1995). NO e espécies reativas de oxigênio são radicais efetores do sistema imune que inibem diretamente a replicação de patógenos. Portanto, derivados de NO bloqueiam infecções (Nathan & Shiloh, 2000).

2.1.2 Atividade

Uma vez induzida, iNOS produz continuamente altos níveis de NO até a enzima ser degradada (Geller & Billiar, 1998). Essa enzima é um homodímero na sua forma ativa, e apenas o domínio oxigenase é essencial para formar o dímero (Stuehr & Ghosh, 2000). A dimerização é necessária para a atividade da iNOS (**Figura 3**), participa do processo regulatório e é alvo para intervenção terapêutica (Kone *et al.*, 2003).

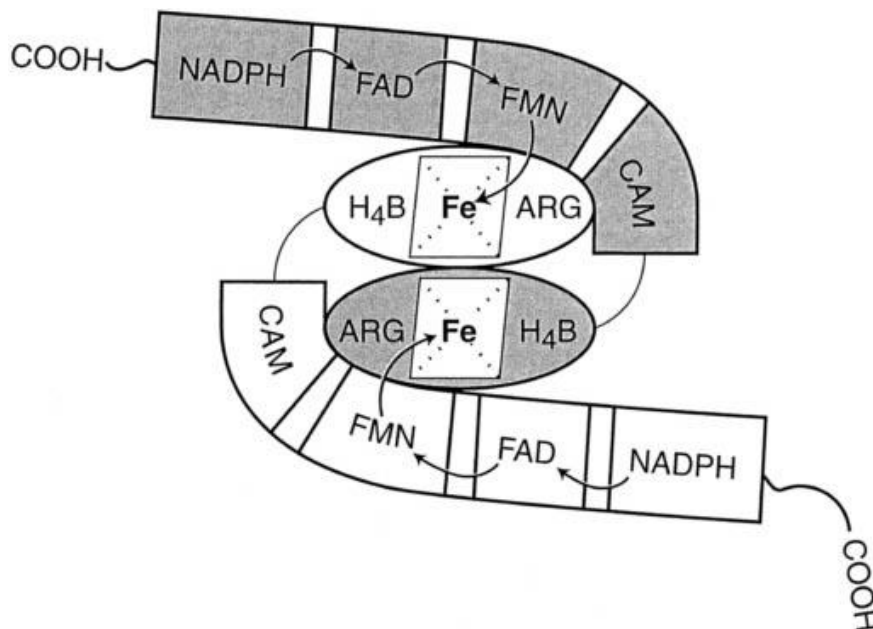


Figura 3: Importância da dimerização para completar a transferência de elétrons na oxido nítrico sintase induzida (iNOS). No dímero de iNOS, cada domínio redutase transfere elétrons (setas) da NADPH via FMN para o heme do domínio oxidase. L-arginina (ARG), heme (Fe), tetrahydrobiopterina (H₄B), Calmodulina (CAM), Flavina Mononucleotídeo (FMN), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH). Fonte: Siddhanta *et al.* (1998).

Os cofatores FMN e heme da iNOS são ligados a uma mesma cadeia polipeptídica e a existência da tetrahydropterina e um íon de zinco coordenado estabiliza a iNOS como um homodímero e a faz um sistema multipotente (Alderton *et al.*, 2001). A iNOS interage com moléculas inibitórias, como kalirina, tão bem quanto com proteínas ativadoras como a Rac GTPase. Moléculas inibitórias agem bloqueando a atividade catalítica da iNOS, por exemplo, prevenindo a dimerização, enquanto moléculas ativadoras podem redirecionar a iNOS na célula, como, por exemplo, interagindo com Rac e redirecionando a iNOS para domínio apical do epitélio para interagir com proteínas intermembranares e aumentar a produção de NO. Além disso, interações entre proteínas que controlam a transcrição da iNOS podem ativar ou suprimir sua indução por citocinas (Kone *et al.*, 2003).

Os domínios FMN e heme da iNOS são conectados pela ligação com a CaM, que é requerida e obrigatória, pois transferem elétron do domínio redutase para o oxigenase, sendo outro alvo regulatório (Stevens-Truss *et al.*, 1995). CaM, uma proteína de ligação de Ca^{2+} que participa de muitas vias de sinalização, foi a primeira interação demonstrada com as isoformas de NOS. Todas as três isoformas são dependentes de CaM para síntese de NO (Abu-Soud & Stuenkel, 1993). A ligação de CaM aumenta a taxa de transferência de elétrons de NADPH para os dois domínios redutases de FMN e também leva a transferência de elétrons do domínio redutase para o heme no domínio oxigenase (Gachhui *et al.*, 1996). Essa transferência intraproteína é outro alvo de regulação da síntese de NO (Li *et al.*, 2011). A dependência de Ca^{2+} tem distinguido a iNOS das outras duas isoformas, pois a CaM se liga a iNOS de maneira irreversível e independente desse íon, enquanto nas outras isoformas a ligação é reversível e só acontece com aumento da concentração de Ca^{2+} (Knudsen *et al.*, 2003). Independente da ligação de CaM com a iNOS ser capaz de aumentar a atividade de transferência elétrons na enzima, quando Ca^{2+} está presente, a transferência de elétrons entre as duas flavinas é facilitada, aumentando a produção de NO (Xiao *et al.*, 2007).

2.1.3. Regulação da atividade

A atividade da iNOS pode ser controlada através da regulação da sua síntese, da atividade catalítica ou da sua degradação (Kolodziejcki *et al.*, 2002). iNOS é expressa em resposta a estímulos por citocinas ou por patógenos (Garcin *et al.*, 2008). Algumas citocinas induzem a expressão da iNOS (IFN- γ , TNF- α), outras agem como citocinas inibitórias como: fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), Interleucina (IL)-4, IL-10, IL-13 e fator de desativação de macrófago (De Servi *et al.*, 2002; Hesse *et al.*, 2001; Lowenstein & Padalko, 2004; Rozenfeld *et al.*, 2005). TGF- β , por exemplo, inibe a expressão da iNOS através de mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais (Vodovotz *et al.*, 1993). TGF- β bloqueia a transcrição da iNOS inibindo a expressão da proteína enoveladora HMG-I(Y). Muitas outras moléculas sinalizadoras, incluindo IL-4, IL-10, IL-13 e fator de desativação de macrófago também inibem a expressão da iNOS (Lowenstein & Padalko, 2004).

Uma variedade de estímulos extracelulares pode ativar diferentes vias de sinalização que convergem para iniciar a expressão da iNOS (Lowenstein & Padalko, 2004). Componentes da parede celular de bactérias e fungos podem disparar cascatas de sinalização, levando à expressão da iNOS. Lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, pode se ligar à proteína ligadora de LPS (LBP), que transfere o LPS ao CD14, um receptor de alta afinidade para LPS. O receptor Toll-like 4 (TLR4) junto com uma pequena proteína extracelular, a MD-2, interage com o complexo CD14-LPS, e então ativa uma cascata de sinalização intracelular, incluindo a via MAPK e a via do NF- κ B. Essas vias convergem para a ativação da transcrição da iNOS (Lowenstein & Padalko, 2004).

A via de ativação do IFN- γ também ativa a transcrição da iNOS (Lowenstein & Padalko, 2004). O IFN- γ produzido por macrófagos e linfócitos ativados em conjunto com outros agentes, como o LPS, pode, sinergicamente, aumentar a expressão da iNOS. IFN- γ interage com o receptor de interferon 1 (IFNR1) forma um complexo com o IFNR2 que transduz o sinal ativando quinases da família Jak e STAT transcrevendo a iNOS (Darnell *et al.*, 1994).

iNOS difere das outras isoformas por produzir grandes quantidades de NO (Pandit *et al.*, 2009). A alta produção de NO pela iNOS pode causar danos aos tecidos, porém seu potencial benefício para o hospedeiro é relevante (Nathan, 1997). A quantidade NO produzida pela iNOS depende tanto do nível de expressão da enzima no tipo celular específico como da sua atividade enzimática (Balligand & Mayer, 2000). Praticamente todo NO produzido se liga ao grupamento heme férrico antes de ser liberado, este é um exemplo em que a liberação do produto pode controlar a catálise enzimática (Tejero *et al.*, 2009). Então, sintetizar NO é necessário, mas não é suficiente, é necessário ter um controle dos ciclos de redução do grupamento heme e dissociação do NO (Santolini *et al.*, 2001).

Alta produção de NO pela iNOS tem sido ligada a doenças inflamatórias, neurodegenerativas (Feng, 2012). Derivados de imidazol pirimidina se ligam a iNOS na forma ativa, levam a monomerização bloqueando a dimerização de forma irreversível, inibindo a produção de NO pela iNOS de forma fisiológica (Nagpal *et al.*, 2013). Este pode ser um alvo de estudo para o possível controle da produção de NO em tais doenças.

A atividade da arginase é outra forma de modular a produção de NO, pois reduz a disponibilidade de L-arginina para iNOS (Li *et al.*, 2012). Arginase utiliza o mesmo substrato (L-arginina) que a iNOS e tem um papel importante no sistema imune hospedeiro. Arginase 1 é induzida em macrófagos ativado e suprime a produção de NO na infecção intracelular (El Kasmi *et al.*, 2008). A arginase utiliza L-arginina para produzir uréia e L-ornitina, essa última é precursora na síntese de poliaminas. Por utilizar o mesmo substrato que a iNOS, a atividade da arginase pode diminuir a produção de NO por reduzir a disponibilidade de L-arginina para a iNOS (Li *et al.*, 2012).

A taxa de formação de citrulina não é linear indicando que há um processo de retroalimentação negativa da regulação da iNOS pelos seus próprios produtos (Rogers & Ignarro, 1992), indicando que essa é uma retroalimentação negativa no controle da produção de NO pela iNOS.

A transcrição de iNOS é controlada pela proteína OPN, um potente transrepressor da expressão da iNOS. A concentração de OPN aumenta quando há ativação celular com LPS. Em modelos de macrófagos murinos estimulados com LPS, a OPN aumenta a ubiquitinação da STAT1 γ , e sua

subsequente degradação pelo proteossomo, o que impede a transcrição e expressão da iNOS (Gao *et al.*, 2007).

A transferência de elétrons entre os domínios da proteína de FMN para o domínio heme é essencial na síntese de NO pela iNOS. Na holoenzima, a velocidade na transferência de elétrons entre os domínios da iNOS é a conversão do estado de acceptor de elétrons para um novo estado de doador de elétrons e a iNOS permanece principalmente no estado de acceptor de elétrons (Feng *et al.*, 2009).

As interações do interdomínio FMN/heme são importantes na transferência final de elétrons da iNOS, que é essencial pra entrega de elétrons requerido para ativação do O₂ no domínio heme e a subsequente produção de NO (Sembombe *et al.*, 2009). Também é importante ressaltar que essas interações regulam a catálise da iNOS através da modulação da atividade e estrutura do heme no sítio ativo (Sempombe *et al.*, 2011). Essas interações do interdomínio FMN/heme exercem mudanças de longo alcance na interação heme-substrato que determinam as vias de oxidação do substrato da iNOS, através da transferência de elétrons para o grupamento heme que subsequentemente reage com o substrato (Sempombe *et al.*, 2011). O domínio FMN tem um resíduo crítico, o glutamato 658, que é descrito como essencial para atividade da iNOS, sendo importante para manter o dímero, necessário para atividade dessa enzima (Liu *et al.*, 2009). Sendo assim, ressalta-se a importância do domínio redutase no controle da atividade da iNOS.

Heme-proteínas são essenciais para vida e desempenham papéis fundamentais na transferência de elétrons, em transformações oxidativas, eliminação de radicais livres, transdução de sinal e transporte e armazenamento de oxigênio (Chakravarti *et al.*, 2010). Heme livre é tóxico para célula, e é mantido em níveis basais. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) está associada a iNOS nas células. GAPDH se liga ao heme livre ou a iNOS de forma NO sensível, e entrega o heme à iNOS através de um processo que é regulado pela sua nitrosilação (**Figura 4**) (Chakravarti *et al.*, 2010).

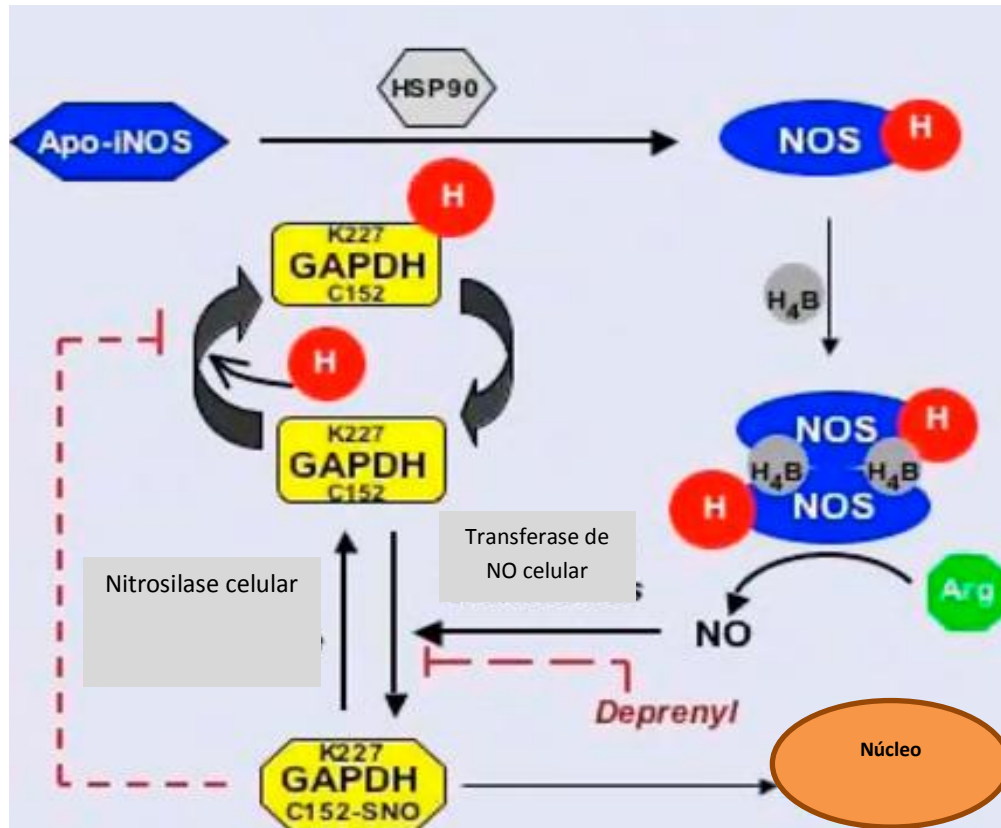


Figura 4: Regulação do heme pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Modelo da função do GAPDH na inserção do heme (H) na iNOS e sua regulação por S-nitrosilação. GAPDH se liga ao heme e interage com apo-iNOS nas células. Esse processo envolve HSP90. O monômero ligado ao heme então dimeriza e se liga ao cofator H4B para formar uma iNOS ativa que pode sintetizar NO a partir de arginina (Arg). O NO produzido faz com que GAPDH se transforme em SNO-GAPDH, por um processo de nitrosilação e SNO-GAPDH inibe a inserção de heme na iNOS. A formação de SNO-GAPDH pode ser inibida farmacologicamente por deprenyl, permitindo a inserção de heme à iNOS, produzindo mais NO. Fonte: Chakravarti *et al.* (2010).

O íon de ferro no grupamento heme pode estar em duas formas: reduzida (ferroso) ou oxidada (férrico); e ambos os complexos existem na forma ligada a iNOS (**Figura 5**) e são essenciais no controle da reatualização da iNOS, da síntese de NO e no controle da célula hospedeira através da síntese de peroxinitrito (Hursheaman & Marletta, 1995; Tejero *et al.*, 2009).

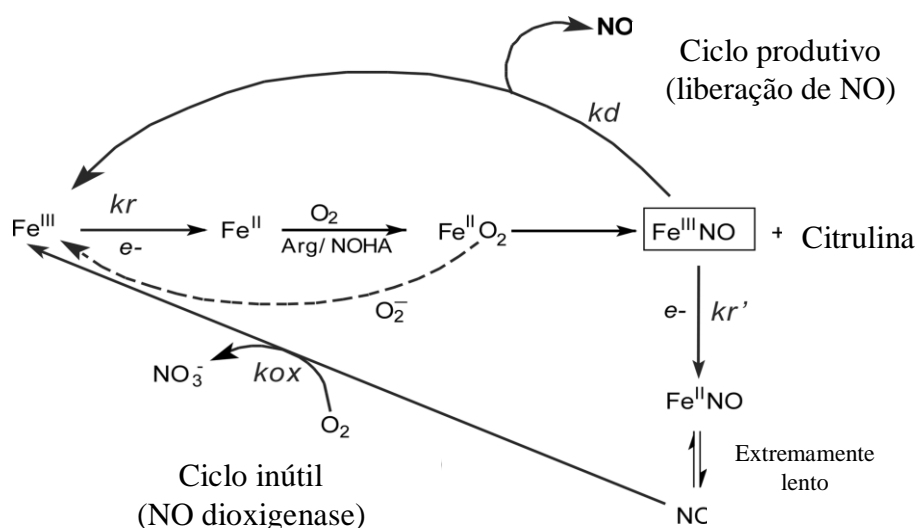


Figura 5: Modelo cinético de síntese de NO pela iNOS envolvendo o Fe do grupamento heme. A redução do estado do ferro do grupamento heme de férrico para ferroso (Kr) permite a ligação do O₂ e o início das reações catalíticas. O intermediário, complexo NO heme férrico (Fe^{III}NO) é gerado, podendo liberar o NO (Kd) (Ciclo produtivo) ou ser reduzido (Kr') para o complexo NO heme ferroso (Fe^{II}NO). Este complexo dissocia-se lentamente produzindo NO₃⁻ e a forma férrica através da enzima Kox (Ciclo inútil). Fonte: Wang (2012).

CaM foi conhecida por interagir com iNOS e é necessária para a sua atividade enzimática, sendo assim um fator regulatório. A ligação de CaM aumenta as taxas de transferência de elétrons de NADPH para o domínio redutase e aceptores de elétrons, como citocromo c (Gachhui *et al.*, 1996), pois facilita a interação entre os domínios FMN/heme (Sempombe *et al.*, 2009). Essa ligação é também importante para transferência de elétrons do domínio redutase para o domínio heme (Abu-Soude *et al.*, 1994). Porém a ligação da CaM não tem efeito na termodinâmica do processo redox e sim através do controle de mudanças conformacionais necessárias para transferência de elétrons efetiva, sendo essa ligação um processo chave para o controle da transferência de elétrons intradomínios e conseqüentemente da catálise da iNOS (Li *et al.*, 2010). Sabe-se que a atividade da iNOS, isolada do fígado de cobaia, pode ser inibida pela quelação de íons de Ca²⁺ (Shirato *et al.*, 1998) e iNOS humana parece requerer uma quantidade mínima de Ca²⁺ para que ocorra ligação ótima com CaM (Geller & Billiar, 1998).

BH₄ também desempenha uma função estrutural importante na iNOS e na transferência de elétrons. Esse cofator promove a formação do dímero da

iNOS, aumenta a afinidade da ligação com arginina e desempenha função redox, induzindo mudança no estado redox do ferro. O domínio é reduzido para liberação do radical e a BH₄ permanece livre, para ser utilizada na segunda etapa para produção de NO (Wang *et al.*, 2012).

BH₄ também é um fator crucial para ativação fisiológica da iNOS (Alderton *et al.*, 2001). Na ausência de BH₄, ocorre um “desacoplamento”, que é consumo de NADPH independente da oxidação da L-arginina, e então o produto da reação passa a ser superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Gorren & Mayer, 2002). Excessiva formação de O₂⁻ H₂O₂ e após expressão da iNOS mediada por citocina pode exceder a capacidade do sistema oxidante levando ao estresse oxidativo (Monkra & Monkry, 2007).

O resíduo Arginina 375 da iNOS forma ponte de hidrogênio com BH₄ e é responsável pela estabilização do dímero de iNOS (Wang *et al.*, 2012). Essa ligação regula o ritmo e extensão da transferência de elétrons entre BH₄ e espécies dioxi-ferrosas e controla a reatividade do composto formado pela transferência de elétrons, durante o estado estacionário na síntese de NO. Então Arginina 375 modula a função redox de BH₄ e é importante no controle da função catalítica da iNOS (Wang *et al.*, 2012).

2.2 DEGRADAÇÃO DA iNOS

Embora muito se saiba sobre síntese e atividade catalítica da iNOS, pouco se conhece sobre o mecanismo de sua degradação. As vias da calpaína, lisossomos e proteossomo-ubiquitina são os principais sistemas proteolíticos responsáveis pela regulação da degradação da iNOS (Kone *et al.*, 2003).

2.2.1 Proteossomo

O proteossomo é um complexo enzimático que degrada proteínas poliubiquitinizadas em pequenos peptídeos (Pines & Lindon, 2005; Ciechanover, 2005). É composto por dois subcomplexos, um que transmite a atividade catalítica e outro, que é uma partícula regulatória.

A subunidade 26 do proteossomo tem sido identificada como a principal via responsável pela degradação da iNOS (Kolodziejcki *et al.*, 2002). A subunidade 26 do proteossomo é formada pela partícula 20, responsável pela atividade

proteolítica, e duas partículas regulatórias 19, que são responsáveis pela interação com o substrato (Kloetzel, 2004) (**Figura 6**).

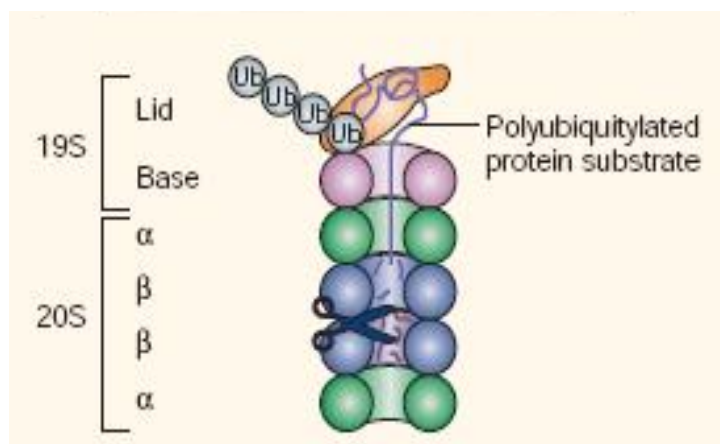


Figura 6: Subunidade 26 do proteossomo. Proteossomo, 26S, esquematizado mostrando suas subunidades, 20S responsável pela atividade catalítica e 19S que é a subunidade regulatória. Fonte: Modificado de Ciechanover (2005).

A subunidade 20 degrada proteínas intracelulares e é regulada por complexos protéicos que se ligam à estrutura cilíndrica do proteossomo. Um desses complexos regulatórios, o regulador 11S, conhecido como REG ou PA28, estimula a atividade peptidase do proteossomo e aumenta a produção de peptídeos antigênicos para apresentação pelo MHC classe I. A ligação do REG causa mudanças conformacionais que abrem um poro na subunidade 20S do proteossomo onde substratos e produtos podem passar (Knowlton et al., 1997).

O proteossomo pode ser inibido por muitas drogas, sendo a lactocistina um potente inibidor (Gaczynska & Osmulski, 2005), reconhecido como altamente específico contra o proteossomo (Musial & Eissa, 2001). Clasto- lactocistina β -lactona é uma reorganização estrutural da lactocistina. Outra droga também muito utilizada é a MG132, o derivado de aldeído com melhor atividade inibitória. Na concentração de 50-100 μ M esta molécula inibe todas peptidases proteossomais. MG132 é usado com frequência em culturas de células quando se necessita de um inibidor barato e reversível (Gaczynska & Osmulski, 2005).

A ubiquitinação é requerida para ativar proteínas quinases, mediar interações entre proteínas e marcar proteínas para endocitose (Pines & Lindon, 2005). Além disso, ubiquitina tem outra importante função celular: o endereçamento de proteínas para a degradação pelas vias do proteossomo e lisossomal. A cadeia de ubiquitina é reconhecida por receptores no proteossomo e, assim, as proteínas são transportadas para a digestão (Voges et al., 1999).

Resultados obtidos com células de rim embrionárias HEK293, células epiteliais de brônquios A549, e macrófagos murinos RAW 264 mostram que a iNOS é sujeita a ubiquitinação e esta é requerida para sua degradação e, conseqüentemente, interfere com a sua taxa de *turnover* (Kolodziejcki et al., 2002).

Três enzimas estão envolvidas na cascata de conjugação de ubiquitina: E1, enzima ubiquitina de ativação; E2, proteína ubiquitina de conjugação; e E3, ubiquitina ligase. Cada E1 transfere ubiquitina para todas as E2 na célula, e o pequeno repertório de E2 transfere a ubiquitina para ou E3 ou para um resíduo de lisina do substrato (Pines & Lindon, 2005).

Entender a regulação da degradação da iNOS é importante, pois mostra como a célula controla o nível de NO durante a inflamação e ação microbicida do hospedeiro. A iNOS é direcionada para ubiquitinação e após esse processo é degradada via proteossomo (Kolodziejcki et al., 2002). A degradação da iNOS é uma eficiente forma da modulação do NO visto que o processo de controle para degradação de proteínas celulares é altamente seletivo (Kolodziejcki et al., 2002).

2.2.2 Calpaína

Calpaínas são cisteíno-proteinases, não lisossomais, encontradas em todas as células animais. Existem 14 membros da família de genes de calpaína representados no genoma humano (Goll et al., 2003). A maioria das calpaínas nos tecidos é do tipo μ - ou m-calpaína (**Figura 7**). Ambos são heterodímeros compostos de subunidades catalíticas e uma pequena subunidade não catalítica, que é requerida para a atividade da proteinase (Mellgren et al., 2006). Estas proteases têm sido implicadas em funções pró- e anti-apoptóticas.

Também tem sido investigado o envolvimento de calpaínas na autofagia (Demarchi & Schneider, 2007). A calpaína pode ser inibida pela calpeptina (Musial & Eissa, 2001).

Estudos com macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS, demonstram que dexametasona promove a degradação proteolítica da iNOS, e que o monômero de iNOS é um substrato direto para clivagem pela calpaína I dependente de Ca^{2+} (Walker et al., 1997).

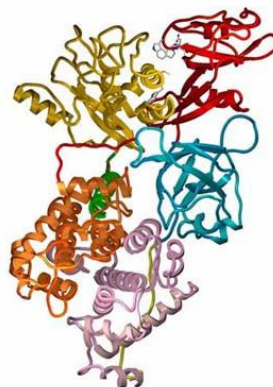


Figura 7: Estrutura cristalográfica da m-Calpaína humana. Os domínios da proteína aparecem em cores diferentes (Strobl et al., 2000).

2.2.3 Lisossomo

Os lisossomos são compartimentos envoltos por membrana única, com aproximadamente 60 hidrolases ácidas e 7 proteínas de membrana (Eskelinen *et al.*, 2003). Sua atividade é realizada em pH ótimo ácido (Dice, 2000), sendo responsáveis pela degradação de componentes extracelulares obtidos via endocitose e intracelulares via autofagia (**Figura 8**) (Eskelinen, 2005; Klionsky, 2007).

As hidrolases ácidas são responsáveis por degradar especificamente um tipo de substrato, deste modo, são encontradas mais de 50 tipos dessas hidrolases nos lisossomos (Van Meel & Klumperman, 2008). As principais proteínas de membrana são aquelas associadas a lisossomos, que possuem papel essencial na manutenção da integridade e estabilidade dessa organela e no processo de acidificação próton-ATPases que é essencial na maturação deste compartimento celular (Marsh *et al.*, 1987).

Compreender a formação dos lisossomos, bem como todo o funcionamento do sistema endo-lisossomal tem se tornado um desafio para muitos pesquisadores. Este sistema compreende uma intrincada rede de vesículas e túbulos que recebem, processam e redirecionam moléculas do exterior ou interior da célula (Bird *et al.*, 2009). Vesículas de transporte que se formam a partir da invaginação da membrana plasmática são carregadas para o endossomo primário, onde seu conteúdo pode ser reciclado e retornar para a superfície celular ou ser retido no endossomo primário, no qual, através de diversos processos de fusão e fissão, se transformam em corpos multivesiculares, também conhecidos como endossomos tardios (Bird *et al.*, 2009). Posteriormente, estes corpos multivesiculares sofrem processos de fusão, fissão e amadurecem, dando origem aos lisossomos, que se fundem com a membrana plasmática liberando seus conteúdos (Bird *et al.*, 2009). A maturação de endossomos primários em lisossomos é marcada pelo decréscimo gradual no pH destas vesículas, o qual é essencial para a ativação das enzimas residentes que degradam o material exógeno liberado no lúmen dos lisossomos (Bird *et al.*, 2009). Portanto, a inibição da acidificação desses compartimentos de células inibe a ação de lisossomos. Durante este processo de maturação há uma intensa comunicação entre compartimentos endo-lisossomais e a rede trans-Golgi, assegurando que novas enzimas sintetizadas sejam liberadas apropriadamente nos lisossomos e que os componentes presentes nestas organelas possam ser internalizados no aparelho de Golgi para reutilização (Bird *et al.*, 2009).

ATPases vacuolares são bombas de prótons presentes nas membranas dos lisossomos, que permitem a entrada de prótons do citoplasma para o interior destas organelas (Forgac, 2007), criando um potencial de membrana interno positivo, fazendo com que seu pH fique em torno de 4,5 (Maxfield & Yamashiro, 1987). O processo de acidificação também é afetado por diversos fatores independentes como sódio ATPase, potássio ATPase, influxo de íons como cloro (Cl⁻) ou efluxo de cátions como cálcio (Ca²⁺) e sódio (Na⁺) (Marshansky & Futai, 2008).

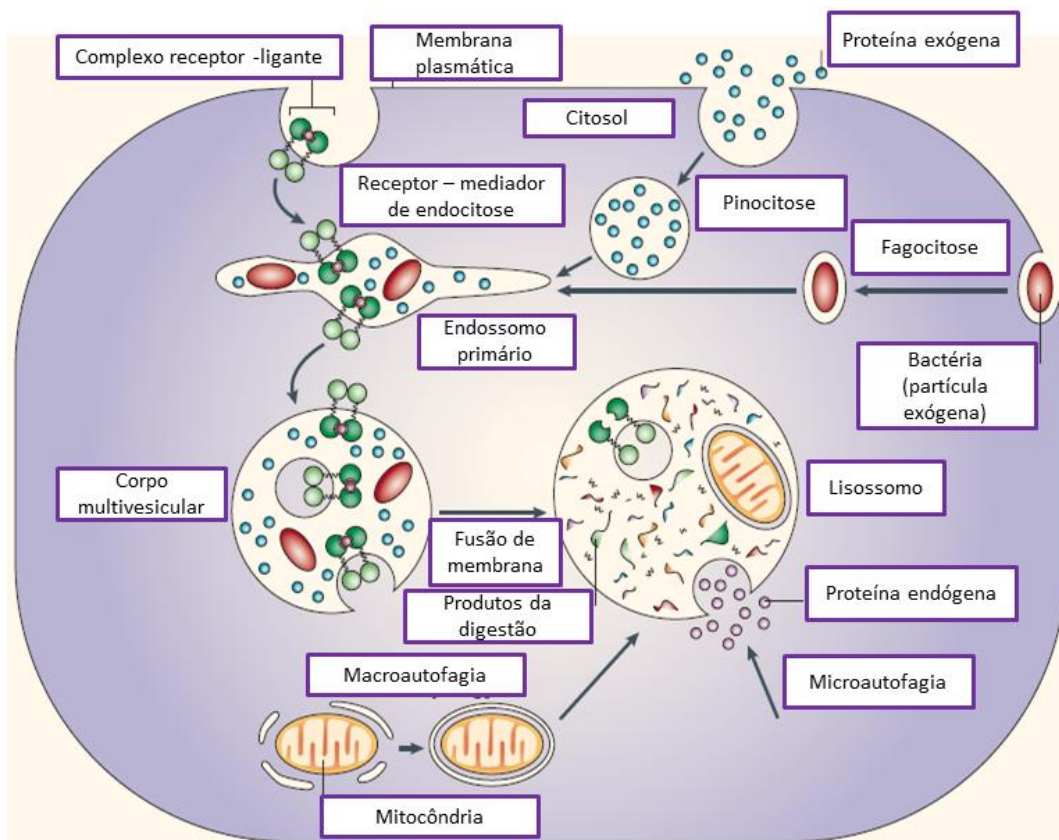


Figura 8: Mecanismos de proteólise mediados pelos lisossomos. Endocitose mediada por receptor; pinocitose; fagocitose e autofagia. Modificado de Ciechanover (2005).

Proteínas celulares podem ser degradadas nos lisossomos. Uma das vias mais importantes é a via de degradação de proteínas citosólicas, que sofrem modificações pós-traducionais através da ligação de uma sequência de aminoácidos que endereçam essas proteínas para os lisossomos (Dice, 1995). Esta via é restrita para proteínas que tem a sequência de peptídeos Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (sequência KFERQ). Após ligação deste peptídeo sinal, as proteínas passam pela bicamada lipídica e entram nos lisossomos, onde sofrem a ação de hidrolases, especificamente proteinases, e são degradadas (Dice, 1995). Como a iNOS é uma proteína expressa no citoplasma dos macrófagos, levantamos a hipótese do possível envolvimento dos lisossomos na degradação desta enzima.

Por sua importância na manutenção da homeostase celular, defeitos no funcionamento dos lisossomos, principalmente na atividade de suas enzimas (Duve, 1975), podem causar consequências devastadoras como: doenças neurológicas, musculares, diversos tipos de câncer e imunodeficiências

(Futerman & Meer, 2004; Kroemer & Jäätelä, 2005; Mohamed & Sloane, 2006; Nixon, 2005; Saftig *et al.*, 2001).

2.2.4 Agrossomos

Agrossomos são corpos de inclusão citoplasmática formados em situações de estresse celular (Kolodziejska *et al.*, 2005). Para a formação do agrossomo é essencial a presença de microtúbulos intactos, pois estes são responsáveis por mover o agregado de proteínas para a região perinuclear, perto do centro organizador de microtúbulos e do centrossomo (Wigley *et al.*, 1999). Diversos estudos mostram que agentes despolimerizadores de microtúbulos como o Nocodazol impedem a formação perinuclear dos agrossomos (Cardinale *et al.*, 2001). Ao tratar as células com esta droga, os agrossomos perdem sua localização perinuclear e se dispersam pelo citosol em pequenos agregados, mostrando assim, o caráter reversível dos agrossomos (Cardinale *et al.*, 2001).

A formação de agrossomo é também um “mecanismo fisiológico” para regular algumas proteínas celulares, como a iNOS (Kolodziejska *et al.*, 2005) e não apenas uma resposta a proteínas mal enoveladas. Kolodziejska *et al.* (2005) mostram que a iNOS é inicialmente expressa como uma proteína citoplasmática, mas se localiza perinuclearmente se houver inibição da atividade do proteossomo (Kolodziejska *et al.*, 2005). A proteína CHIP possui papel essencial na formação do agrossomo de iNOS devido a sua função de ubiquitina-ligase, promovendo a ligação da cauda de ubiquitina na iNOS e posterior interação com a histona desacetilase (Sha *et al.*, 2009) (**Figura 9**). A histona desacetilase serve como um adaptador entre a ubiquitina e o motor de dineína que leva a iNOS a região perinuclear (Sha *et al.*, 2009).

Após formação do agrossomo, esta estrutura é degradada pelo processo de autofagia (Levine & Klionsky, 2004). O agrossomo é sequestrado em vesículas autofagossomais que se fundem com os lisossomos e sofrem ação das enzimas hidrolíticas (Levine & Klionsky, 2004).

Durante a ativação clássica de macrófagos, a célula produz mais NO e, num *feedback* negativo, a iNOS é degradada para evitar danos celulares (Kolodziejska *et al.*, 2005). As células podem usar a via do agrossomo como

um rápido meio para inativar a iNOS por sequestrá-la para uma localização perinuclear, formando assim o agrossomo de iNOS, na infecção por *T. gondii* (Kolodziejaska *et al.*, 2005).

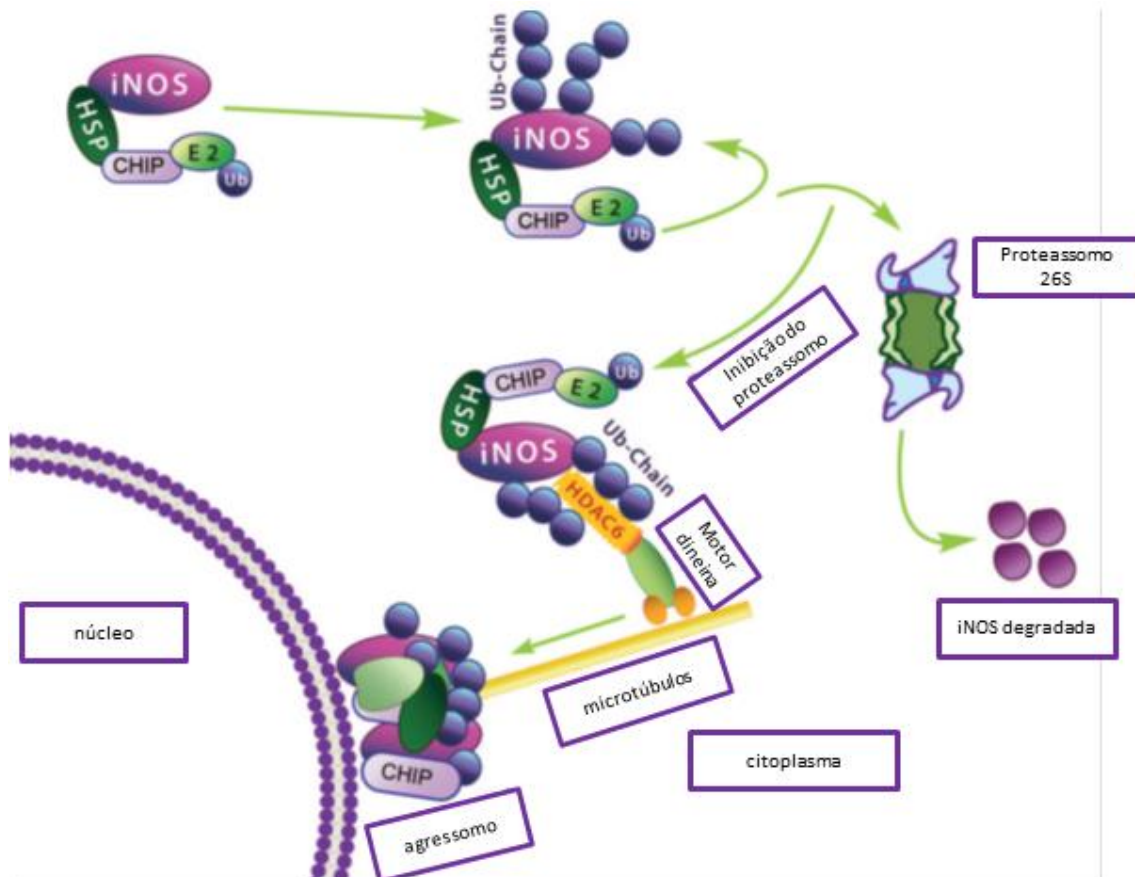


Figura 9: Função da proteína “Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein” (CHIP) na degradação da iNOS via proteossomo e formação do agrossomo com inibição do proteossomo. CHIP recruta proteína 70 de choque térmico (HSP) e a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que realiza a ubiquitinação da iNOS. A iNOS é ubiquitinada ficando “marcada” para degradação no proteossomo. Caso o proteossomo seja inibido, o complexo CHIP-HSP-iNOS ubiquitinada se ligam a *Histone DeAcetylase 6* (HDAC6) que conecta com a dineína transportando o complexo via microtúbulo que acumula no centro celular definindo o “agrossomo da iNOS”. Esse agrossomo é degradado posteriormente por macroautofagia. Modificado de Sha *et al.* (2009).

2.3 iNOS NA INFECCÃO

A rápida geração de NO pela iNOS é um importante componente do macrófago e desempenha um papel crítico na morte de patógenos intracelulares (Kuang *et al.*, 2010). A infecção por *Toxoplasma gondii* inibe parcialmente a produção de NO em macrófagos murinos ativados, permitindo a persistência do parasita (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo & DaMatta 2004). Essa inibição é maior com o aumento da razão *T. gondii*/macrófago (Seabra *et al.*, 2002). Além disso, parasitas vivos são essenciais para a inibição da produção de NO (Seabra *et al.*, 2002; 2004). *Leishmania sp.* (Proudfoot *et al.* 1996) e *Trypanosoma cruzi* fixado (Pakianathan & Kuhn 1994) e vivos (DaMatta *et al.*, 2007) também conseguem inibir a produção de NO de macrófagos ativados após a interação. Essa capacidade de inibir a produção de NO por protozoários patogênicos é um mecanismo de evasão importante, no qual o conhecimento sobre a regulação da iNOS é chave para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2.3.1 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose, uma doença infecciosa de alta prevalência mundial, é causada por *T. gondii*, um protozoário intracelular obrigatório (Tenter *et al.*, 2000). Esse parasita é amplamente distribuído pelo mundo, em ampla gama de hospedeiros, e é considerado um dos mais bem sucedidos na Terra (Carruthers, 2002). A maioria das infecções é assintomática, mas doenças graves podem surgir em indivíduos imunocomprometidos (Tenter *et al.*, 2000).

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, pertence ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidica, Subordem Eimeriida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma*, Espécie *Toxoplasma gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Esse parasita infecta organismos vertebrados de sangue quente, sendo os felinos seus hospedeiros definitivos (Denkers & Gazzinelli, 1998, Dubey, 1986).

Toxoplasma gondii apresenta um ciclo de vida complexo (**Figura 10**), com fase assexuada, no hospedeiro intermediário, e sexuada no hospedeiro

definitivo. A fase assexuada tem início quando oocistos e/ou cistos teciduais são ingeridos pelo hospedeiro. Os esporozoítos ou bradizoítos são liberados, infectam os enterócitos e transformam-se em taquizoítos, uma forma de rápida multiplicação. A multiplicação ocorre dentro do vacúolo parasitóforo (VP), até que haja o rompimento da célula e a liberação dos parasitas para, então, infectar novas células (Denkers & Gazzinelli, 1998). Taquizoítos da última geração podem iniciar a segunda fase de desenvolvimento, convertendo-se em bradizoítos, com formação de cistos teciduais. Dentro dos cistos, bradizoítos multiplicam-se lentamente. Os cistos localizam-se predominantemente no sistema nervoso central, músculos cardíacos e esqueléticos. Em algumas espécies de hospedeiros intermediários, os cistos permanecem por toda a vida (Tenter *et al.*, 2000).

A fase sexuada do ciclo do parasita inicia-se com a ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos por felinos. Os oocistos rompem-se liberando esporozoítos, os cistos liberam bradizoítos. Estas duas formas invadem as células epiteliais intestinais, onde ocorre a formação de taquizoítos. Estes se multiplicam e invadem as células vizinhas e disseminam a infecção. Parasitas que se multiplicam no epitélio intestinal de felinos podem iniciar a fase sexuada do ciclo de vida. Para tal, estes se diferenciam em várias formas intermediárias até que se transformam em gametócitos masculinos e femininos, e fecundam-se formando o zigoto, que se desenvolvem nas células epiteliais intestinais até o estado de oocisto, que será eliminado nas fezes. Os oocistos, ao serem liberados no ambiente, esporulam e, em cerca de quatro dias, geram esporozoítos aptos a infectar novos hospedeiros (Frenkel *et al.*, 1970).

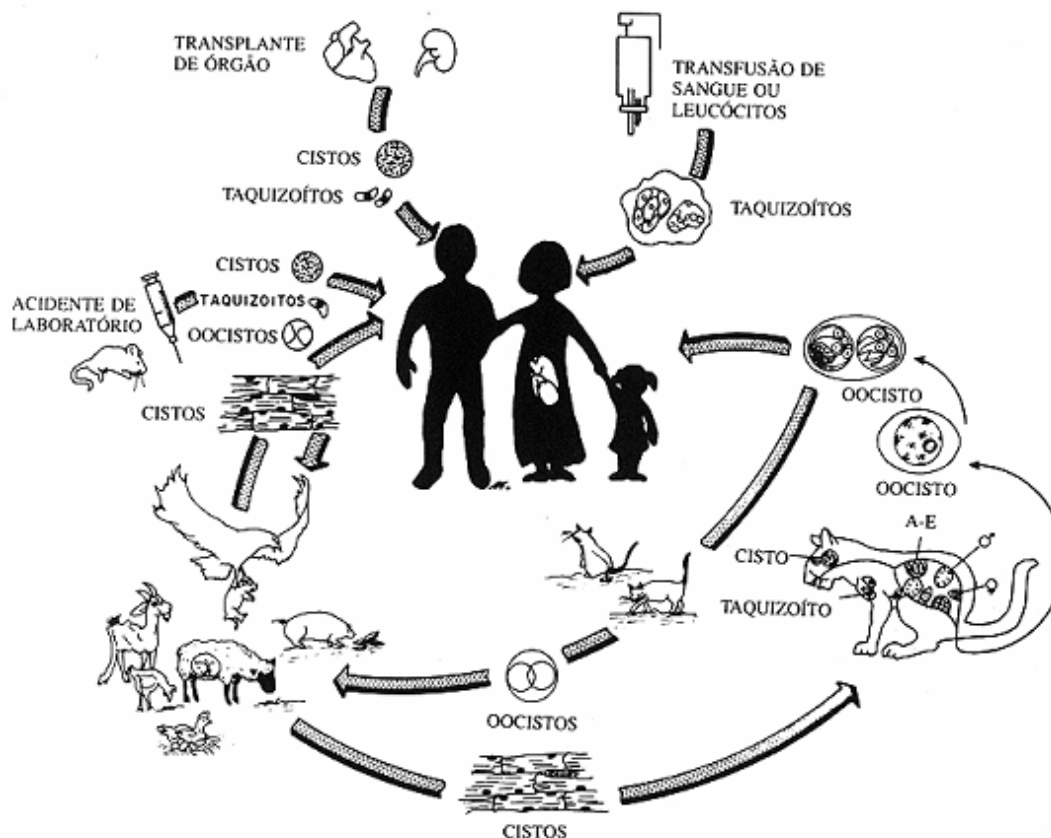


Figura 10: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Parasita em seus vários hospedeiros, formas, e seu mecanismo de transmissão (Fonte: Dissertação de Miriam de Souza Macre, USP, 2002).

Uma característica do ciclo de vida de *T. gondii* é a habilidade desse parasita de induzir infecção crônica por um longo período em teoricamente todos os mamíferos ou aves. Isso ocorre devido às adaptações hospedeiro-parasita, incluindo o processo de diferenciação do parasita, como a conversão da forma de taquizoíto para a forma de bradizoíto, formação e remodelamento do vacúolo parasitóforo (VP) e modulação da resposta imune hospedeira, tanto para sinais externos quanto para infecção intracelular (Lüder *et al.* 2009).

O grupo dos Apicomplexa é caracterizado pela presença do complexo apical, importante no processo de penetração ativa realizado pelo parasita (Dubremetz, 1998). A penetração ativa do parasita na célula hospedeira está relacionada a sua sobrevivência no interior da célula. Ao contrário, na fagocitose, o processo é direcionado pelo fagócito e culmina na morte do parasita dentro do fagolisossoma. A fagocitose ocorre geralmente com parasitas opsonizados com anticorpos (Wilson *et al.*, 1980).

Na penetração ativa ocorre a formação de um VP. O parasita comprime-se na junção formada entre a membrana da célula hospedeira e o parasita (Alexander et al., 2005). Esse processo permite que componentes da membrana da célula hospedeira sejam excluídos da membrana do novo VP onde o parasita reside (Lingelbach & Joiner, 1998). No entanto, proteínas da membrana da célula hospedeira são seletivamente excluídas da membrana do VP, enquanto que proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol são incluídas (Mordue et al., 1999), levando à formação de um vacúolo que resiste a típica fusão que ocorre entre fagossomo e lisossomo e que não acidifica (Jones and Hirsch, 1972; Sibley et al., 1985; Joiner et al., 1990), permitindo a sua sobrevivência (Dubremetz, 1998).

Toxoplasma gondii possui uma via secretora bem desenvolvida que inclui retículo endoplasmático, complexo de Golgi e três organelas distintas morfológicamente, características dos apicomplexa: róptrias, micronemas e glânulos densos (Liendo & Joiner, 2000). Róptrias e micronemas liberam seus conteúdos no momento da invasão. As proteínas das micronemas são, possivelmente, usadas para o reconhecimento da célula hospedeira, ligação e motilidade, enquanto que os produtos das róptrias podem ser usados para a formação do VP. A exocitose dos grânulos densos ocorre após a invasão e continua durante a residência intracelular do parasita (Dubremetz, 1998). A figura 11 mostra as organelas nas formas de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii*.

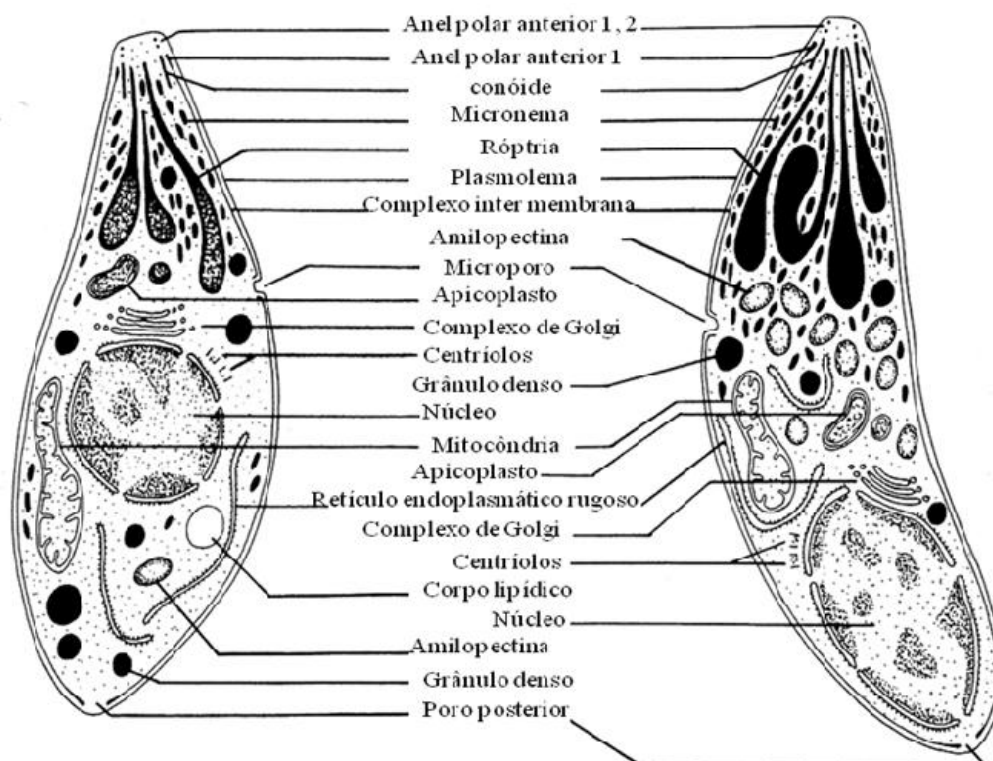


Figura 11: Desenho esquemático de *T. gondii*. O desenho foi baseado em micrografia eletrônica e mostra as organelas de taquizoítos (esquerda) e bradizoítos (direita) de *Toxoplasma gondii*. (Modificado de Dubey *et al.* 1998).

Mecanismos imunes mediados por células desempenham as principais funções no controle da infecção com *T. gondii*, porque o parasita é exclusivamente intracelular (Yap & Sher, 1999; Denkers & Gazzinelli, 1998, Rozenfeld *et al.*, 2005). Em hospedeiros imunocompetentes, os parasitas induzem uma forte resposta tipo I mediada por célula T, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ . A infecção de *T. gondii* é letal na ausência dessas citocinas. No entanto, a forte resposta Th1 gerada durante a infecção deve ser regulada por fatores anti-inflamatórios, como IL-10, para que a resposta não leve a uma doença imunológica (Scharton-Kersten *et al.*, 1996) STAT1 é essencial para mediar os efeitos do IFN- γ . Camundongos deficientes na sinalização STAT1 são extremamente susceptíveis a infecções virais e bacterianas (Lang *et al.*, 2007).

Macrófagos e células NK são a primeira linha de defesa contra o parasita durante a fase inicial da infecção (Sher *et al.*, 1993; Gazzinelli *et al.*, 1993, Lang *et al.*, 2007). IL-12, produzida por macrófagos, neutrófilos e

especialmente por células dendríticas, é crucial para a indução de uma resposta imune eficiente contra *T. gondii*, que resulta na diferenciação e expansão clonal de células T, tipo Th1 (Lang *et al.*,2007). A figura 12 mostra de forma resumida a resposta imune contra infecção aguda de *T. gondii*.

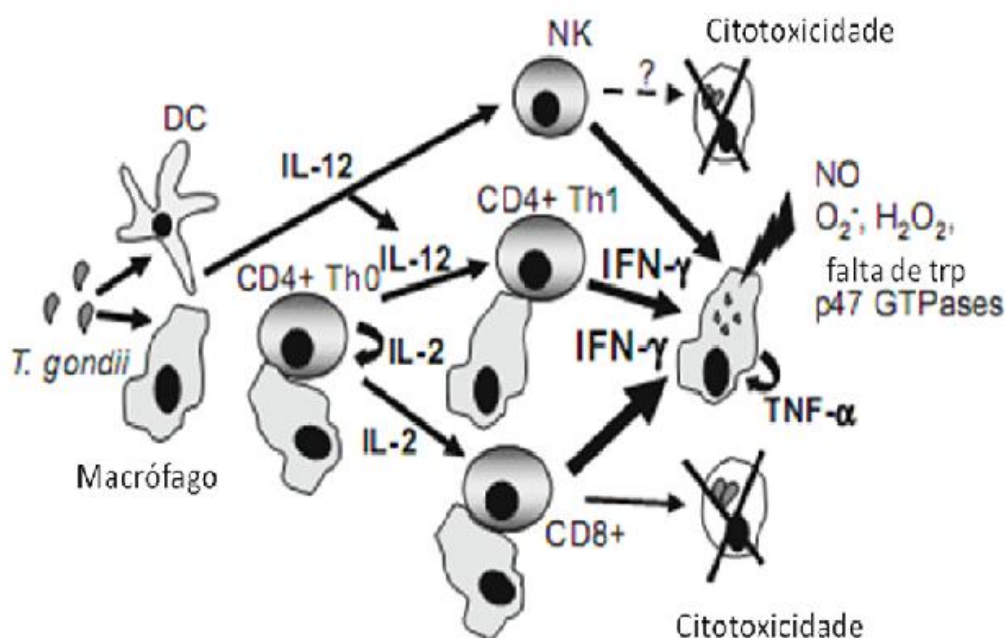


Figura 12: Representação esquemática dos mecanismos efetores regulatório e anti-parasitário durante a infecção com *Toxoplasma gondii*. DC: células dendríticas, NK: células matadoras naturais, NO: óxido nítrico, Trp: triptofano. Fonte: Lang *et al.*,2007).

Toxoplasma gondii é um patógeno oportunista em indivíduos imunocomprometidos, por exemplo, pacientes que sofrem de AIDS ou são submetidos a terapia imunossupressora. A infecção com *T. gondii* pode resultar em toxoplasmose com encefalite, lesões necróticas no sistema nervoso central ou retinocoroidites (Ambroise-Thomas & Pelloux 1993; Ferreira & Borges 2002, Lang *et al.*, 2007).

É evidente, hoje, que o parasita antagoniza parcialmente ou mesmo subverte a resposta inflamatória hospedeira. Além de regular positivamente moléculas anti-inflamatórias hospedeiras como IL-10, TGF-β e lipoxina 4, *T. gondii* também modula diretamente diferentes cascatas de sinalização pré inflamatória (Butcher *et al.*, 2001, 2005; Kim *et al.*, 2004; Seabra *et al.*, 2004;

Shapira *et al.*, 2005). Junto com os efeitos anti-inflamatórios, a infecção com *T. gondii* restringe a produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α das células dendríticas, macrófagos e/ou células T. Ativação de STAT3 dirigida pelo parasita suprime a produção de TNF- α e IL-12 induzido pelo LPS em células hospedeiras não infectadas com *T. gondii* (Butcher *et al.*, 2005). Enquanto em células infectadas, STAT3 é ativado pela ligação com receptor de IL-10, em células infectadas com *T. gondii* a ativação de STAT3 é independente de IL-10 para estabelecer um meio ambiente que efeitos anti-inflamatórios contrabalançam respostas pré-inflamatórias do hospedeiro. A habilidade para modular a sinalização de STAT3 difere significativamente dependendo da linhagem genotípica de *T. gondii* e da ROP16, uma proteína da rópria que é uma organela específica dos apicomplexas (Saeij *et al.*, 2007).

Durante a fase efetora da resposta imune, IFN- γ é envolvido no controle da infecção de *T. gondii* (Suzuki *et al.* 1988). IFN- γ ativa tanto células efectoras hematopoiéticas quanto não-hematopoiéticas para restringir a replicação de parasitas intracelulares ou mesmo matar *T. gondii* intracelular (Yap & Sher 1999). Dependendo da espécie hospedeira, a formação de espécies reativas de oxigênio e NO ou a falta de triptofano pode realizar um importante efeito anti-parasítico induzido pelo IFN- γ . Junto com o IFN- γ , outras citocinas pré inflamatórias, como exemplo, TNF- α , IL-6 e IL-1, tem efeitos sinérgicos na indução da resposta imune adequada contra *T. gondii* (Sibley *et al.* 1991; Langermans *et al.* 1992; Chao *et al.* 1994; Halonen *et al.* 1998 Lang *et al.* 2007). *Toxoplasma gondii* dispara a secreção tanto de citocinas pré inflamatórias (IFN- γ , IL-12, TNF- α) quanto anti-inflamatórias (TGF- β , IL-10) depois da infecção na fase aguda (Gazzinelli *et al.* 1996). Durante a toxoplasmose aguda, IL-10 realiza um duplo papel na supressão da resposta imune tanto de humanos quanto de camundongos. Primeiro, ele inibe a produção de IFN- γ , e possibilita a proliferação de linfócitos T. Segundo, IL-10 pode também desativar macrófagos, através da diminuição da atividade toxoplasmática induzida pelo IFN- γ (Bogdan & Nathan 1993; Ellis Neyer *et al.* 1997, Lang *et al.* 2007). Além de IL-10, TGF- β também é um importante desativador de macrófago (Langermans *et al.* 2001).

Toxoplasma gondii, no entanto, não interfere apenas na resposta imune do hospedeiro por induzir a expressão e secreção de citocinas anti-

inflamatórias, mas também bloqueia a produção de citocinas pré inflamatórias na fase crônica. A infecção de macrófago peritoneal de camundongo residente e células dendríticas imaturas com *T. gondii* não induz a produção de IL-12 e TNF- α *in vitro* (Reis E Sousa *et al.* 1997; Butcher *et al.* 2001; Mckee *et al.* 2004). Em contraste, macrófagos e células dendríticas que foram pré ativadas e então infectadas são capazes de liberar IL-12 e TNF- α (Reis e Sousa *et al.* 1997), explicando a produção dessas citocinas pré inflamatórias *in vivo* (Gazzinelli *et al.* 1993). Sendo IFN- γ é a principal citocina mediadora da resistência contra *T. gondii* (Suzuki *et al.*, 1988), a inibição da sua atividade transcricional pelo parasita intracelular deve ser crucial para sobrevivência intracelular e para estabelecer a persistência da infecção.

A infecção por *T. gondii* inibe parcialmente a produção de NO em macrófagos murinos ativados, permitindo a persistência do parasita (Seabra *et al.*, 2002, 2004; Guillermo & DaMatta 2004). Essa inibição é maior com o aumento da razão *T. gondii*/macrófago. Além disso, parasitas vivos são essenciais para a inibição da produção de NO. Então, a penetração ativa de *T. gondii* é requerida para essa inibição (Seabra *et al.*, 2002, 2004).

O primeiro mecanismo de evasão descrito de *T. gondii* foi a inibição da fusão lisossomal com o vacúolo parasitóforo (Jones & Hirsch, 1972). Também tem sido demonstrado que o NF- κ B de macrófagos infectados com *T. gondii* não é translocado para o núcleo depois da ativação com LPS (Dobbin *et al.*, 2002; Butcher *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2002); e o mecanismo de evasão de *T. gondii* relatado para o NF- κ B é dependente do efeito autócrino do TGF- β ₁ (Seabra *et al.*, 2004). O aumento da expressão de Smad 2 e Smad 3 em macrófagos infectados, e a falta de NF- κ B no núcleo, causada pela infecção por *T. gondii* são importantes evidências que esse fator direciona a desativação do macrófago através de uma via de sinalização autócrina (Seabra *et al.*, 2004). NF- κ B é um importante regulador da expressão de genes inflamatórios. A regulação transcricional da iNOS, do gene da iNOS são complexas e não são bem entendidas, mas parecem ser reguladas em parte pelo NF- κ B. NF- κ B inativo é encontrado no citoplasma, ligado a uma de três isoformas de proteínas inibitórias. O complexo ubiquitinado é então proteoliticamente degradado pelo complexo proteossomo 26S, resultando na forma NF- κ B ativa, que é translocado para o núcleo. A expressão da iNOS em células gliais é

dependente de NF- κ B. MG-132 inibe a ativação de NF- κ B, também suprimindo a expressão da iNOS em astrócitos infectados com vírus *Theiler* (Davis *et al.*, 2005).

Muitas proteínas têm sido identificadas como principais mediadores intracelulares de sinalização de TGF- β_1 (Roberts, 1999). Então a presença de proteínas Smad em macrófagos infectados por *T. gondii* é um indicativo do envolvimento de TGF- β_1 (Seabra *et al.*, 2004). Macrófagos infectados por *T. gondii* secretam TGF- β_1 (Bermudez *et al.*, 1993). A família TGF- β consiste de isoformas (TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3) que são potentes fatores de modulação celular. A secreção do TGF- β_1 é responsável pelo efeito anti-inflamatório e supressão dos efeitos pró-inflamatórios (Tsunawaki *et al.*, 1988). Essa substância é um efetivo desativador de macrófago (Bonta & Parnham, 1978; Ashcroft, 1999). Então, o mecanismo que leva à inibição da produção de NO em macrófagos ativados, envolvendo baixa expressão da iNOS, depois da infecção por *T. gondii* é uma sinalização autócrina envolvendo a desativação dos macrófagos por TGF- β_1 (Seabra *et al.*, 2004). Essa desativação do macrófago é uma importante estratégia do parasita para burlar o sistema imune da célula hospedeira, garantindo a disseminação do parasita (Seabra *et al.*, 2004). Efeitos inibitórios do parasita na expressão da iNOS na microglia ativada com IFN- γ é dependente da produção de TGF- β_1 pela microglia infectada com *T. gondii*, resultando na inibição da produção de NO (Rozenfeld *et al.*, 2005).

Fosfatidilserina (PS) é um glicerofosfolípido presente na membrana plasmática e é o principal ligante envolvido na percepção de células apoptóticas por células vizinhas ou macrófagos que as fagocitam. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos induz uma resposta antiinflamatória baseada na ligação de PS ao seu receptor levando a secreção de TGF- β_1 (Huynh *et al.*, 2002). Tudo indica que *T. gondii* mimetiza uma célula apoptótica e expõe PS na sua membrana plasmática levando à indução da secreção de TGF- β_1 , com efeito autócrino, síntese de interleucina-10 (IL-10) e inibição da produção de NO pelos macrófagos infectados, resultando na desativação destes macrófagos (Seabra *et al.*, 2004).

2.3.2 Macrófagos

Uma das funções do sistema imune é proteger contra infecções controlando o desenvolvimento e a virulência de patógenos que invadem um organismo. O macrófago é uma célula do sistema imunológico, pertence à linhagem mielóide, sendo derivado de uma célula hematopoiética multipotente na medula óssea durante a fase adulta (Sasmono & Hume, 2004). O macrófago é a principal célula diferenciada do sistema mononuclear fagocítico, que inclui monoblastos, promonócitos e monócitos (Auger & Ross, 1992). A ativação de macrófago com IFN- γ desencadeia mecanismos microbicidas e antitumorais (Schroder *et al.*, 2004). Na figura 13, é possível observar o processo de maturação e ativação dos macrófagos de forma resumida. Na linhagem mielóide, a célula multipotente se diferencia em monoblasto, pró-monócito e monócito na medula óssea. Dentro de dois dias, o monócito entra na corrente sanguínea e permanece circulando de 30min a 17h. Esses monócitos vão para o tecido, se diferenciando em macrófagos. Esses macrófagos serão ativados caso haja uma inflamação no tecido ou residentes caso não haja inflamação.

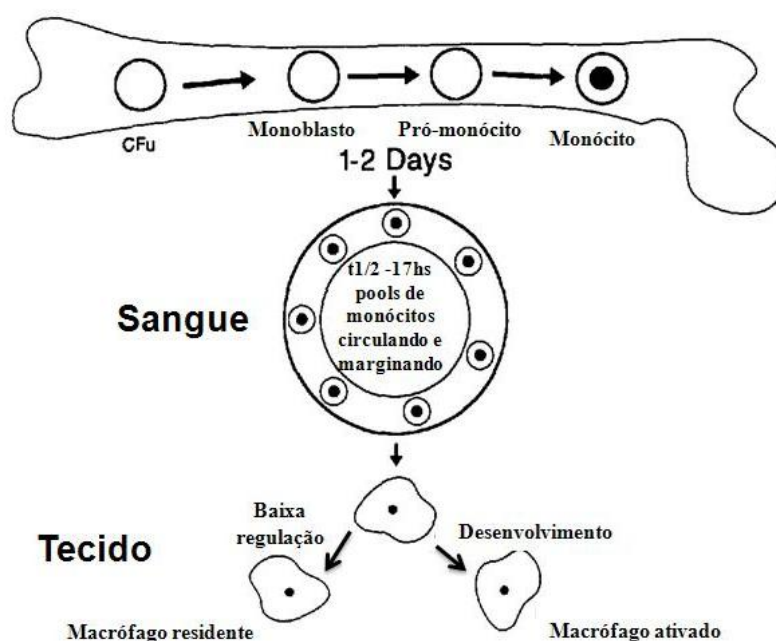


Figura 13: Processo de maturação e ativação de macrófagos. Desenho mostrando maturação da monócito na medula óssea, sua circulação no sangue e sua diferenciação em

macrófagos quando estão em tecidos. No tecido inflamado este macrófago está ativado. (Modificado de ADAMS, 1994).

O sistema mononuclear fagocítico tem sido definido como uma linhagem de células compreendendo precursores da medula óssea, monócito e macrófagos. Porém, tem sido proposto por Hume (2006) que o conceito de linhagem de célula se tornará redundante quando se aumentar o conhecimento da rede transcricional e plasticidade celular. Hume (2006) descreve que a transcrição é um processo probabilístico. Mesmo dentro de um *pool* de células, cada macrófago individual, por exemplo, tem um perfil transcricional singular, e a expressão de um gene não prediz certamente a expressão de outro gene em situações particulares, devido a outro microambiente e estímulo. Então, o número de tipos celulares que se pode definir no sistema imune inato é provavelmente uma função exponencial do número de marcadores que se escolheu empregar. (Hume, 2006).

Os macrófagos são amplamente distribuídos pelo organismo, sendo encontrados principalmente em órgãos linfóides, fígados, pulmões, trato gastrointestinal, cavidades serosas, osso, sinóvia, pele etc (Auger & Ross, 1992) e seus números aumentam na inflamação e ferimento (Hume, 2006). Células da microglia são consideradas como macrófagos residentes do cérebro, porque eles são participantes ativos na resposta imune no sistema nervoso central (Rozenfeld et al., 2005).

Uma das principais funções dos macrófagos é a fagocitose e eliminação de células senescentes. Outra função crucial destas células é a secreção de várias moléculas. Camundongos com mutação no gene que codifica o fator chave de crescimento de macrófago (Hume, 2006), tem sido utilizados para melhor entender a função destas células. Estudos com esses camundongos mostram que os macrófagos também apresentam habilidade em secretar grande diversidade de moléculas reguladoras que influenciam funções fisiológicas e diferenciação de células vizinhas.

Receptores na superfície de macrófagos determinam o controle de suas atividades como diferenciação, crescimento, sobrevivência, adesão, migração, fagocitose, ativação e citotoxicidade. Muitos ligantes têm sido descritos na superfície de macrófagos (revisto por Auger & Ross, 1992), incluindo

receptores para citocinas, componentes do complemento, imunoglobulinas e moléculas de adesão (Adams, 1994). Receptores de superfície de macrófagos regulam muitas funções incluindo. A habilidade desses receptores para reconhecer uma ampla variedade de ligantes endógenos e exógenos e para responder apropriadamente é essencial para as funções desempenhadas pelo macrófago na homeostase, assim como na defesa do hospedeiro na imunidade inata e adquirida, autoimunidade, inflamação e imunopatologias (Gordon, 2002; Gordon, 2003a; Kaufmann *et al.*, 2004). Estudos da expressão de antígenos e receptores de antígenos com anticorpos monoclonais mostram que macrófagos do tecido se tornam marcadamente heterogêneos e expressam diferentes fenótipos, refletindo a especialização da função com o microambiente particular (Taylor *et al.*, 2005). O IFN- γ , por exemplo, tem sido descrito como o principal constituinte do fator de ativação de macrófagos (MAF). A ligação de TNF- α , GM-CSF ou IL-2 aos receptores na superfície de macrófagos fazem parte da atividade do MAF (Auger & Ross, 1992).

Macrófagos residentes são encontrados em tecidos onde não há inflamação (Auger & Ross, 1992) ou quando obtidos de organismos normais (não infectados) e, portanto, sem inflamação. Macrófagos residentes apresentam capacidade mínima de destruir microorganismos, secretando proteases em baixa quantidade e pouca capacidade de responder a citocinas (Adams & Hamilton, 1984). Ao contrário, macrófagos ativados exibem aumento em uma ou mais atividades funcionais ou adquirem novas atividades funcionais (Auger & Ross, 1992). Esses ganham competência para cumprir uma ou muitas funções complexas, como destruição de células tumorais ou parasitas intracelulares obrigatórios ou facultativos (Adams, 1994) através, por exemplo, da produção de NO (Stuehr & Marletta, 1985).

Estudos mais recentes descrevem a ativação de macrófagos como sendo clássica ou alternativa (Mosser & Edward, 2008; Gordon, 2003a). O termo ativação clássica é designado para macrófagos efetores, que são produzidos na resposta imune mediada por células. Na ativação clássica, a ativação de macrófagos depende de produtos de linfócitos T auxiliares Th1 e células NK, em particular IFN- γ . O macrófago se torna mais microbicida, produzindo NO. A ativação alternativa é realizada por IL-4 e IL-13, geradas na resposta Th2 (Gordon, 2003^a; Seabra *et al.*, 2002). Nessa ativação, o

macrófago produz IL-10 e não é microbicida. *Toxoplasma gondii* induz a alternância da ativação do macrófago, de ativação clássica para alternativa (Seabra *et al.*, 2002).

Em resposta a inflamação e a estimulação imunológica, monócitos são recrutados ao sítio local, onde eles disparam diferentes fenótipos. O macrófago adapta seu microambiente local e torna-se difícil distinguir do macrófago residente original, que ele mesmo submeteu à ativação pelo estímulo local. exposição do macrófago a produtos microbicidas e citocinas como IFN- γ , *in vitro* e *in vivo*, induzem um estado de ativação diferente. Esses estímulos modulam a expressão de receptores de superfície, atividades secretórias, apresentação de antígenos e co-estimulação e resposta linfócito antígeno específica (Taylor *et al.*, 2005).

2.3.3 Interação entre Macrófago e *Toxoplasma gondii*

A infecção por *T. gondii* inibe parcialmente a produção de NO em macrófagos murinos ativados, permitindo a persistência do parasito (Seabra *et al.*, 2002). Essa inibição é maior com o aumento da razão *T. gondii*/macrófago. Ademais, parasitos vivos são essenciais para a inibição da produção de NO (Seabra *et al.*, 2002). Portanto, a penetração ativa de *T. gondii* é requerida para essa inibição (Seabra *et al.*, 2002; Seabra *et al.*, 2004). A diminuição da produção de NO é devido à degradação da iNOS, enzima que catalisa a reação de produção de NO. A iNOS é induzida nas células de todos os tecidos por citocinas, endotoxinas e outros estímulos pré-inflamatórios (Kone *et al.*, 2003). A produção de NO é indiretamente controlada pela proteína OPN, um potente transrepressor da expressão da iNOS. LPS e/ou citocinas pré-inflamatórias ativam STAT1 que medeia a transcrição da iNOS em camundongos, ratos e células humanas. Em modelos de macrófagos murinos, estimulados com LPS, OPN aumenta a ubiquitinação da STAT1, e sua subsequente degradação pela subunidade 26 do proteossomo para, então, inibir a atividade do promotor da iNOS, sua transcrição e expressão (Gao *et al.*, 2007).

A inibição da iNOS é causada pelo seu desaparecimento. Três vias de degradação da iNOS foram descritas, através da ação: 1) do proteossomo; 2) da calpaína ou 3) do lisossomo.

3 JUSTIFICATIVA

Toxoplasma gondii é o parasito causador da toxoplasmose, amplamente distribuído pelo mundo, em hospedeiros homotérmicos e é considerado um dos mais bem sucedidos na Terra. Sendo assim, torna-se necessário o estudo deste parasito.

Há dados sobre como *T. gondii* burla o mecanismo microbicida do macrófago, permitindo sua disseminação. Muito se conhece também sobre a síntese e atividade catalítica da iNOS, enzima produtora de óxido nítrico (NO), potente agente microbicida. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos e vias de degradação da iNOS. Sendo assim, considerou-se necessário estudar as via de degradação da iNOS em macrófagos ativados e infectados por *T. gondii*, seguindo, então, o modelo de estudo do nosso grupo (Seabra *et al.*, 2002, 2004) e contribuindo para importantes informações para futuras intervenções terapêuticas.

4 OBJETIVOS

- OBJETIVO GERAL

Verificar a via de degradação da iNOS após a infecção de macrófagos ativados por *T. gondii*.

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Confirmar na linhagem de macrófagos J774-A1 a inibição da produção de NO após a infecção por *T. gondii*.

4.2 Inibir a via do proteossomo, da calpaína e do lisossomo e verificar a expressão da iNOS após infecção por *T. gondii*.

4.3 Identificar o agrossomo e confirmar sua ação na degradação da iNOS em macrófagos infectados por *T. gondii*, quando o proteossomo é inativado.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Macrófagos. As linhagens de macrófago J774-A1 e a do fibroblasto Vero foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Para as infecções, os macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços ou em placas de Petri de 10 cm de diâmetro com DMEM suplementado com 5% de SFB.

5.2 Obtenção de *T. gondii*. *Toxoplasma gondii*, cepa RH foi mantida por passagens, de 2-3 dias na cavidade peritoneal de camundongos suíços. A lavagem peritoneal foi realizada com solução Hank's. A suspensão foi centrifugada a 50g, 4°C por 10 min, e o sobrenadante, foi novamente centrifugado a 1000g, 4°C por 10 min para concentrar os taquizoítos. Os parasitas foram ressuspensos em meio DMEM e contados.

5.3 Interação de *T. gondii* com Macrófagos J774-A1. As interações com *T. gondii* foram realizadas por 2, 6 e 24h a 37° C, atmosfera de 5% de CO₂, cada lamínula com 2 x 10⁵ macrófagos, utilizando a proporção de 10:1 protozoários por macrófago. Para as placas de Petri, foram plaqueados 1,5 x 10⁶. Os macrófagos foram ativados com LPS (0,1 µg / mL) e IFN-γ (50 U / mL) com 24h de antecedência à infecção.

5.4 Tratamento com lactocistina, calpeptina ou concanamicina A. Os macrófagos foram tratados com lactocistina a 20µM (inibidor de proteossomo), ou calpeptina a 2500 µM (inibidor de calpaína), ou concanamicina A a 1, 3 e 5 nM (inibidor de ATPase de lisossomo) por 1 hora antes da infecção com *T. gondii*. Após 2, 4, 6, 12, 24 e 48 horas de infecção, lamínulas e sobrenadantes foram coletados em triplicatas e repetidos em três experimentos.

5.5 Marcação de compartimentos ácidos e viabilidade celular por fluorescência com laranja de acridina e brometo de etidio. Macrófagos cultivados foram lavados, incubados por 20 min com 10 µg/mL de laranja de acridina (marcador para compartimentos acídicos) e 25 µg/mL de brometo de etidio (marcador de células mortas) em meio DMEM, lavados, incubados por 15 min com meio a 37°C e 5% de CO₂, montadas em meio e observadas por microscopia de fluorescência. A marcação com este corante

vital revela cor verde para compartimentos de pH básico e cor laranja para compartimentos ácidos.

5.6 Expressão da iNOS e ubiquitina reveladas por imunofluorescência. As lamínulas coletadas foram fixadas por 30 min em 3 % de formaldeído recém-preparado em PBS, lavadas e incubadas por 20 min em 50 mM de NH_4Cl em PBS e 10 min em 3% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS (PBS-BSA). As células foram incubadas por 40 min com anticorpo policlonal anti iNOS de coelho (Santa Cruz) diluído 1:100 em PBS-BSA, e anti- *T. gondii* (soro de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*) diluído 1:5000 em PBS-BSA ou anti ubiquitina de humano (R&D) diluído 1:100 em PBS-BSA. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com PBS-BSA; incubadas por 30 min com o anticorpo anti- IgG de coelho marcado com Alexa 488 (invitrogen) diluído 1:200 em PBS-BSA, lavado 2 vezes com PBS, e montadas em N-propil galacto e as imagens capturadas com câmera AxioCam Mrc5 no sistema Axiovision da Zeiss, com tempo de exposição devidamente padronizado.

5.7 Detecção da iNOS por Western blotting. As células coletadas foram lisadas em meio com Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e PMSF 1 mM, pH 8,0 centrifugadas a 12.000g por 10 min. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976). As proteínas do sobrenadante foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, em condições nativas. 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 (tampão bloqueador) por 2h em agitação ou overnight. Depois a membrana foi lavada cinco vezes e incubadas com o anticorpo primário (anti-iNOS diluído 1:1000 em tampão bloqueador) por 2h sob agitação, e então lavadas novamente cinco vezes com PBS-tween e incubadas com o 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 DAB (diaminobenzidina) e H_2O_2

5.8 Avaliação de nitrito. A produção de NO foi avaliada indiretamente medindo-se o nitrito nos sobrenadantes coletados com 2, 6, 12 e 24h (Griess *et al.*, 1982). Depois, 50µl do sobrenadante de cada poço foram colocados por um mesmo volume em reagente de Griess (1:1, de 0,1% N-1-nafeti-etilanadamina, Sigma – N-5889, em água destilada e 1% de sulfanilamida, Sigma – S-9251 em 5% de ácido fosfórico, Sigma – P581) na placa de 96 poços. Com uma absorbância de 540nm foi medida a concentração de nitrito. A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão pré-calibrada usando nitrito de sódio diluído em DMEM como padrão.

5.9 Identificação do agrossomo de iNOS após inibição do proteossomo em macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii*. As interações de *T. gondii* com os macrófagos foram realizadas por 6h para os experimentos de imunofluorescência. As interações foram realizadas a 37° C, atmosfera de 5% de CO₂, utilizando a proporção de 10:1 parasitos por macrófago. Macrófagos foram tratados, 1h antes da infecção, com Lactocistina para inibição do proteossomo.

5.10 Teste estatístico. Foram realizados Testes t de Student para observar a significância dos resultados utilizando $p < 0,05$, com $n=3$.

6 RESULTADOS

6.1 Confirmação da inibição da produção de NO em macrófagos ativados após infecção por *T. gondii*.

Macrófagos residentes não produzem NO e ativados infectados com *T. gondii* tem a produção de NO inibida (**Tabela 1**).

Tabela 1: Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados e residentes infectados ou não com *Toxoplasma gondii*.

Macrófagos	<i>T. gondii</i>	Prod. de nitrito (μM) / 6h	Prod. de nitrito (μM) / 24h
Residente	+	0,0	ND
Residente	-	0,0	ND
Ativado	+	16,7 \pm 1,88	26,0 \pm 4,08
Ativado	-	30,8 \pm 2,09	63,3 \pm 8,90

Para saber por qual via a iNOS está sendo degradada, avaliamos a produção de NO e a presença da iNOS no citoplasma de macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* inibindo farmacologicamente três principais vias de degradação desta enzima: proteossomo, calpaína e lisossomo. Quando a via do proteossomo foi inibida pela Lactocistina, os macrófagos continuaram expressando a iNOS.

Macrófagos ativados e tratados com Lactocistina, inibidor de proteossomo, continuaram a produzir NO como os controles não tratados (**Figura 14**). Macrófagos ativados, tratados com Lactocistina e infectados com *T. gondii* por 2 h não tiveram a produção de NO inibida (**Figura 14**). No entanto, nota-se que os macrófagos tratados com Lactocistina, mas infectados por 6 h tiveram a produção de NO parcialmente inibida. Esse resultado sugere que a inibição do proteossomo inibe a degradação da iNOS em um primeiro momento (2 h), mas com mais tempo (6 h) a iNOS é parcialmente degradada. Portanto, é possível que na ausência do funcionamento do proteossomo outro sistema de degradação seja acionado.

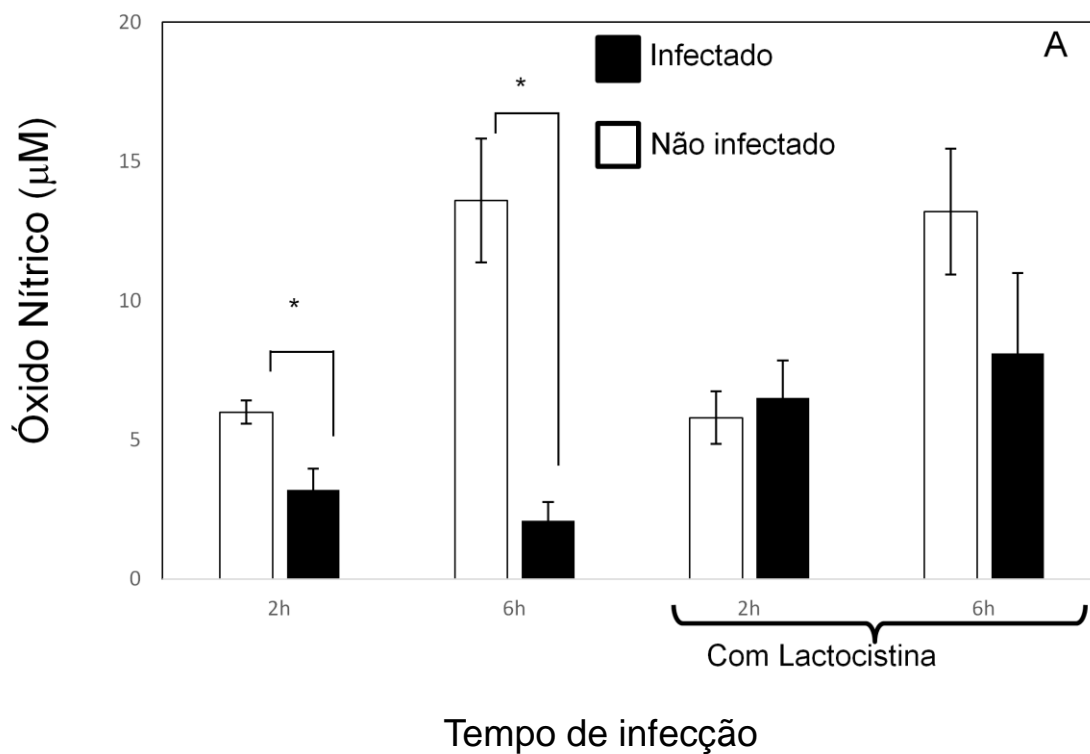


Figura 14. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados (+) ou não (-) com Lactocistina. Macrófagos tratados com lactocistina continuam a produzir NO mesmo infectados com *Toxoplasma gondii*. n=3, * Significativamente diferente (P <0,05).

Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* e tratados com calpeptina, inibidor de calpaína, permanecem com a produção de NO inibida, comprovando que a iNOS não está sendo degradada pela calpaína na infecção pelo *T. gondii* (**Figura 15**).

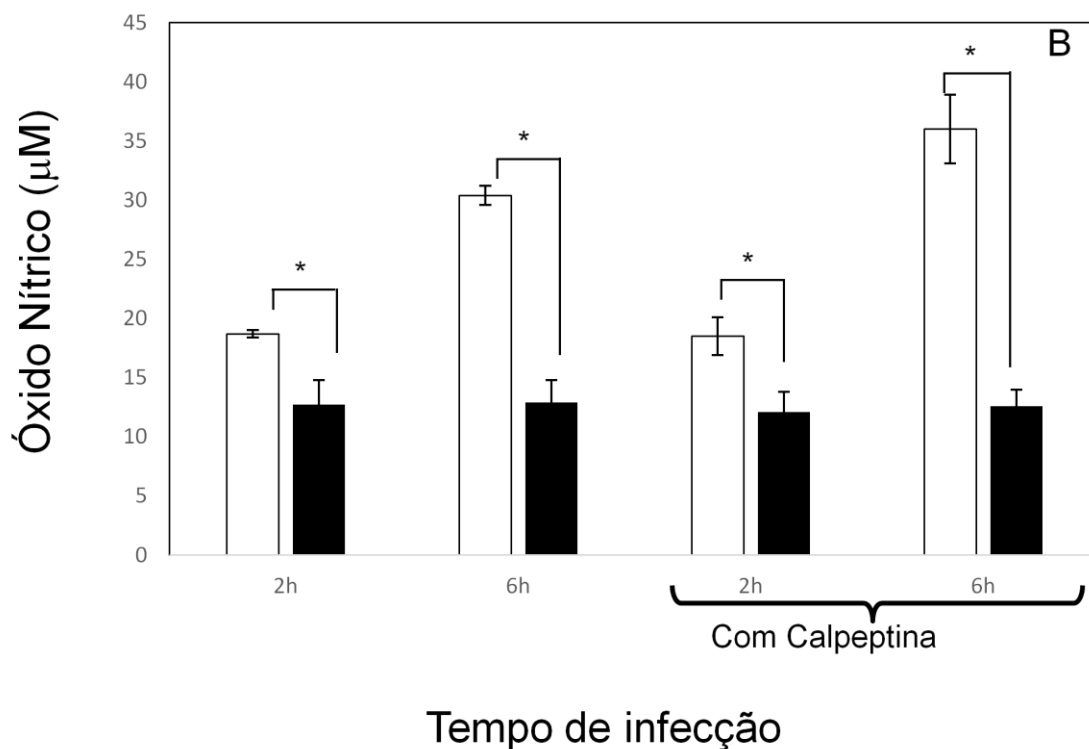


Figura 15. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados (+) ou não (-) com Calpeptina. Macrófagos tratados com calpeptina diminuem a produção de NO assim como os não tratados na infecção por *Toxoplasma gondii*. n=3, * Significativamente diferente (P <0,05).

Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* e tratados com concanamicina, inibidor de lisossomo, permanecem com a produção de NO inibida, comprovando que a iNOS não está sendo degradada pelo lisossomo na infecção por *T. gondii* (**Figura 16**).

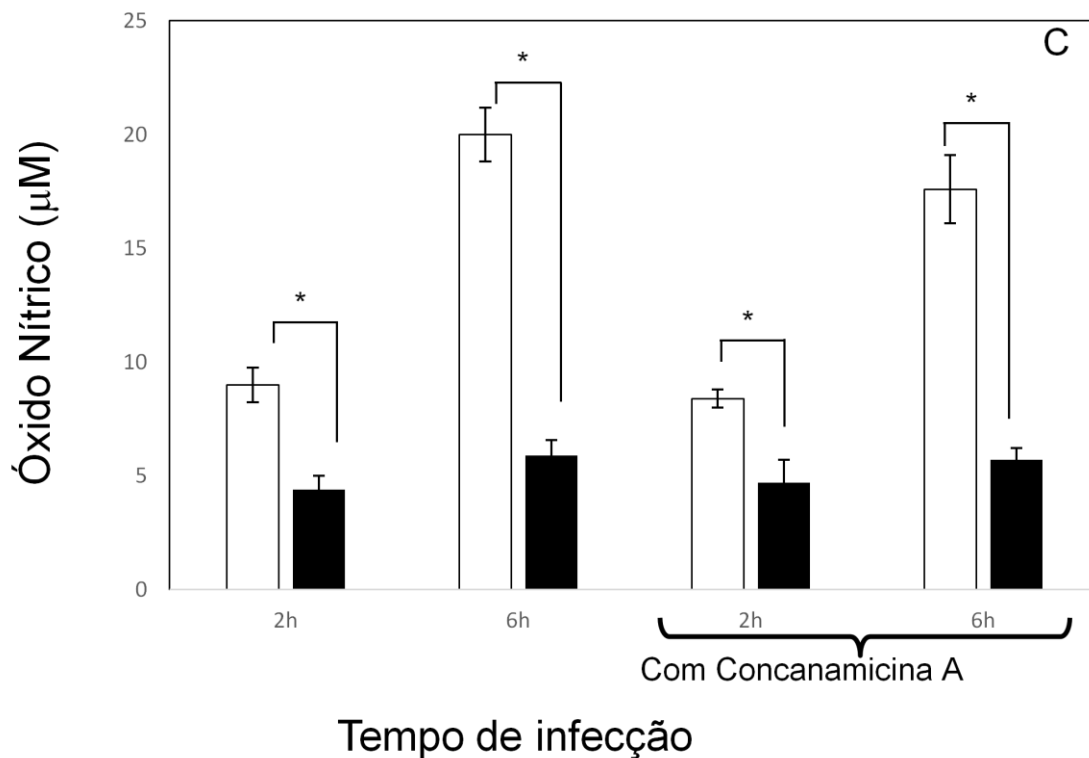


Figura 16. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados (+) ou não (-) com Concanamicina A. Macrófagos tratados com concanamicina A diminuem a produção de NO assim como os não tratados na infecção por *Toxoplasma gondii*. n=3, * Significativamente diferente (P <0,05).

6.2 Avaliação da expressão da iNOS em macrófagos ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T. gondii* ou não.

Para confirmar os resultados anteriores, foram feitas imunofluorescência para verificar a expressão da iNOS no citoplasma dos macrófagos. Macrófagos ativados produzem NO e expressam iNOS (**Figura 17 A**). Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* tem a produção de NO inibida devido ao desaparecimento da iNOS do citoplasma do macrófago (**figura 14 B**). Quando macrófagos são tratados com Lactocistina, inibidor de proteossomo, a iNOS permanece no citoplasma do macrófago infectado por 2 h (**Figura 17 C**), por 6 h (**Figura 17 D**), comprovando que a iNOS é degradada pelo proteossomo na infecção com *T. gondii*. Com a infecção de 6h observa-se um agregado de iNOS na região perinuclear, sugerindo que a via de degradação do agrossomo é ativado com mais tempo de infecção quando o proteossomo está inibido.

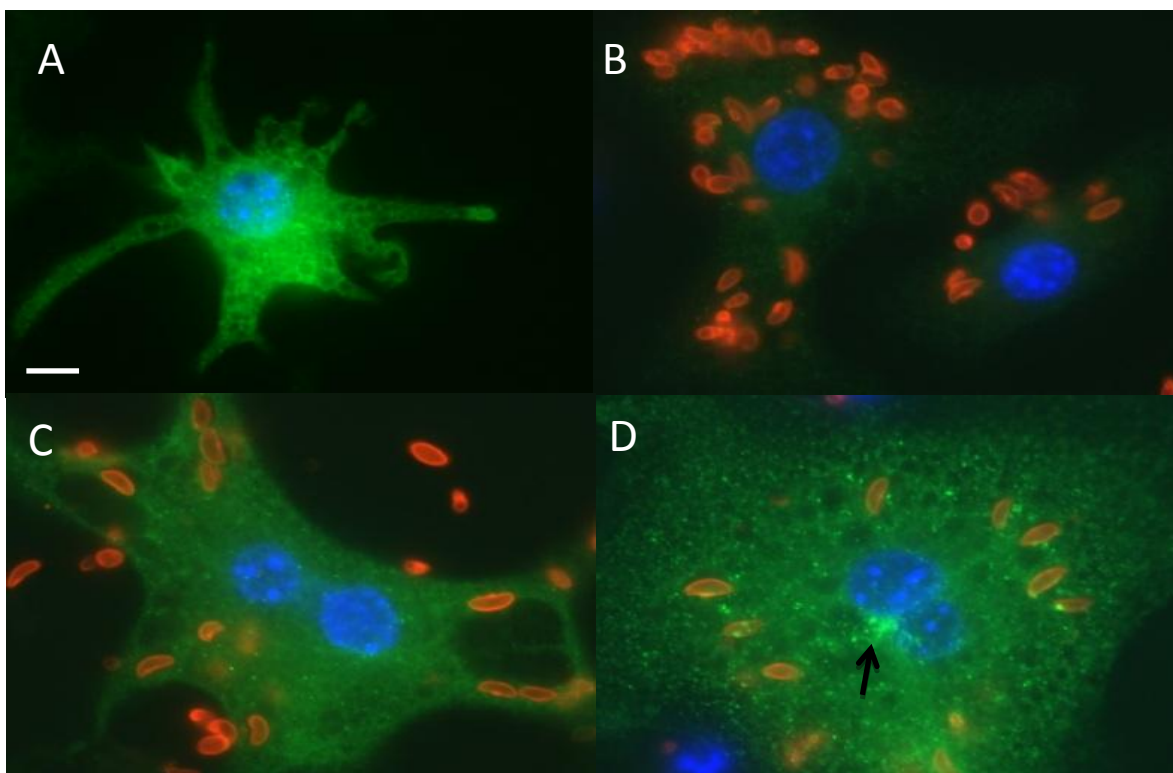


Figura 17. Expressão da iNOS (verde), localização de parasitas (vermelho) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados, tratados com lactocistina e infectados com *Toxoplasma gondii* e. **A:** MØ ativados, 2h. **B:** MØ ativado e infectado com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS reduzida. **C:** MØ ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS é mantida. **D:** MØ ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T.gondii* por 6 horas. A expressão da iNOS foi mantida e acumulada na região perinuclear. Barra: 10µm. n=3.

6.3 Avaliação da expressão da iNOS em macrófagos ativados tratados com calpeptina e infectados com *T. gondii* ou não.

Macrófagos ativados produzem NO e a iNOS pode ser visualizada no seu citoplasma (**Figura 18**). Macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* têm a produção de NO diminuída, assim como a expressão da iNOS (**Figure 18 B**). Essa diminuição ocorre devido a degradação da iNOS que não é via calpaína, já que macrófagos tratados com inibidor de calpaína, calpeptina, tem a produção de NO diminuída (**Figura 18 C,D**).

Em macrófagos tratados com calpeptina, inibidor de calpaína, a iNOS desaparece do citoplasma do macrófago (**Figura 18 C,D**), comprovando que a iNOS não é degradada pela calpaína na infecção com *T. gondii*.

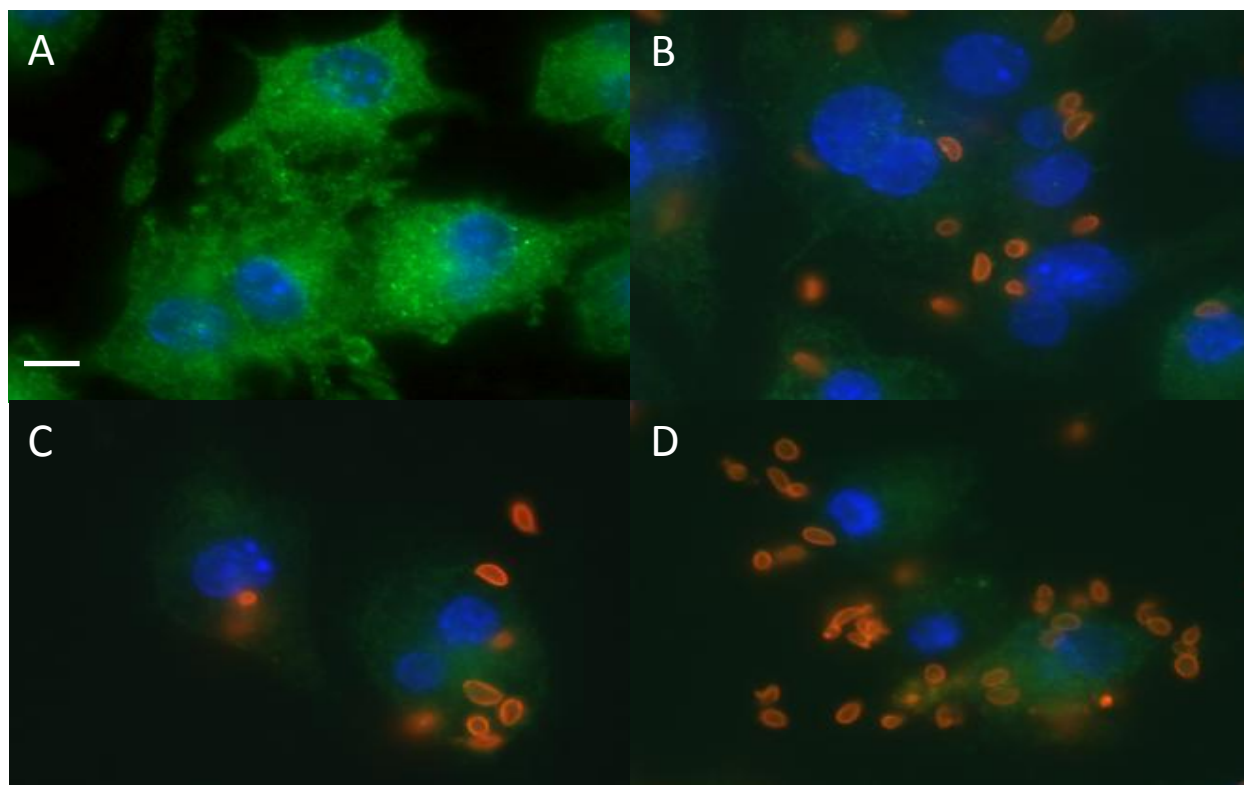


Figura 18. Expressão iNOS (verde), localização de parasitas (vermelho) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com calpeptina. **A:** MØ ativados, 2h. **B:** MØ ativado e infectado com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS reduzida. **C:** MØ ativados, tratados com calpeptina e infectados com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS é reduzida. **D:** MØ ativados, tratados com calpeptina e infectados com *T.gondii* por 6 horas, expressão da iNOS permanece reduzida. Barra: 10µm. n=3.

6.4 Avaliação da expressão da iNOS em macrófagos ativados com LPS IFN- γ , tratados com concanamicina A e infectados com *T. gondii* ou não.

Em macrófagos tratados com concanamicina, inibidor de lisossomo, a iNOS desaparece do citoplasma do macrófago em 2h (**Figura 19 C**) e em 6h (**Figura 19 D**), comprovando que a iNOS não é degradada pelo lisossomo na infecção com *T. gondii* (**Figura 19**).

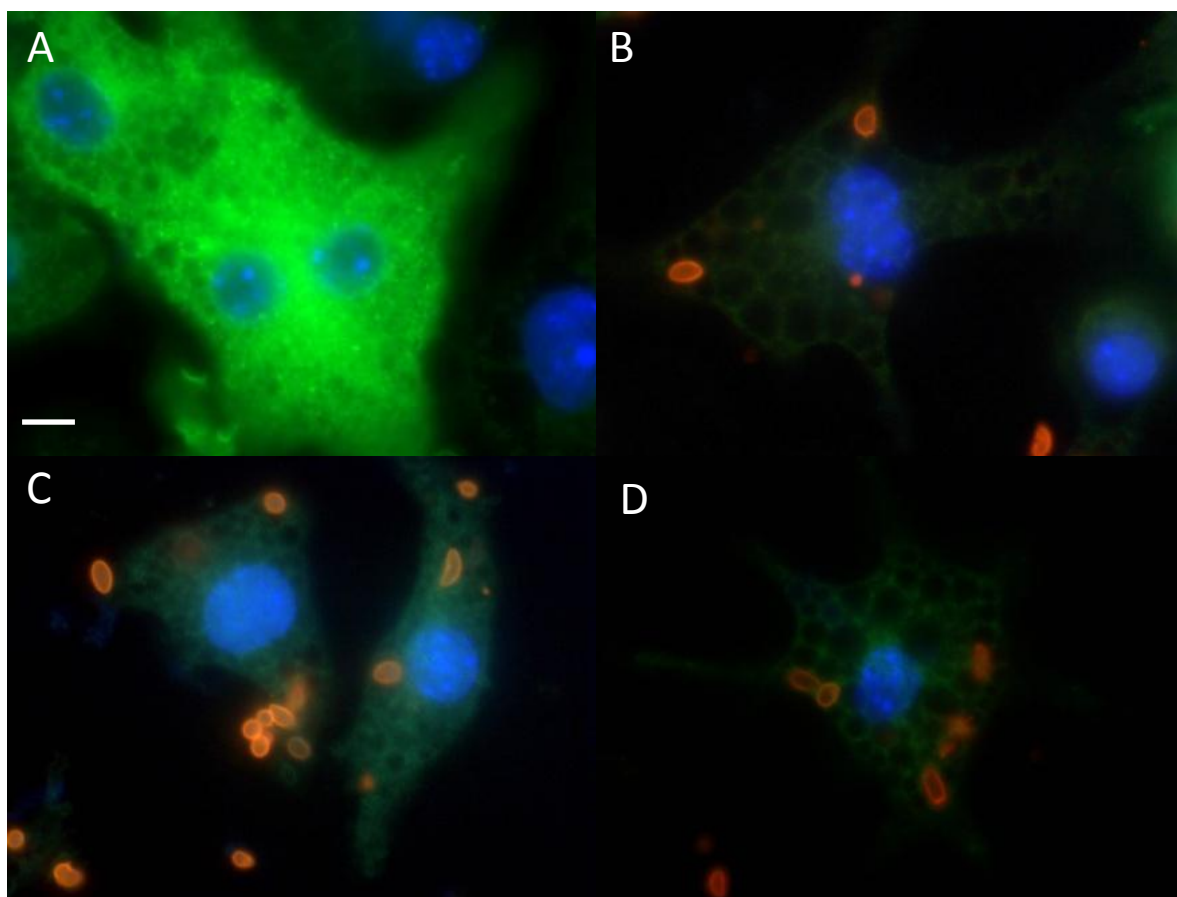


Figura 19. Expressão iNOS (verde), localização de parasitas (vermelho) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com concanamicina. **A:** MØ ativados, 2h. **B:** MØ ativado e infectado com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS reduzida. **C:** MØ ativados, tratados com concanamicina e infectados com *T.gondii* por 2 horas, expressão da iNOS é reduzida. **D:** MØ ativados, tratados com concanamicina e infectados com *T.gondii* por 6 horas, expressão da iNOS permanece reduzida. Barra: 10µm. n=3.

A **figura 20** confirma os resultados anteriores mostrando a expressão da iNOS maior em macrófagos tratados com lactocistina. O resultado do western blotting mostra claramente que a via da calpaína não está envolvida na degradação da iNOS (**Figura 20 A4**), pois a inibição da expressão da iNOS continua ocorrendo, assim como ocorre com o macrófago ativado e infectado com *T. gondii* (**Figura 20 A2**). Ao contrário, o resultado confirma que a via do proteossomo está envolvida na degradação da iNOS, pois a expressão da iNOS é maior em macrófagos tratados com o inibidor de proteossomo (**Figura 20 A3**). Porém, a expressão da iNOS não é a mesma do controle (**Figura 20**

A1), provavelmente porque a iNOS está sendo direcionada para via do agrossomo e sendo degradada via lisossomo. O que explica porque a produção de NO é parcialmente inibida quando os macrófagos são tratados com o inibidor do proteossomo e infectados por 6 h (**Figura 14**). O próximo passo do nosso trabalho é caracterizar a via do agrossomo em macrófagos ativados, infectados com *T. gondii* e tratados com inibidor de proteossomo.

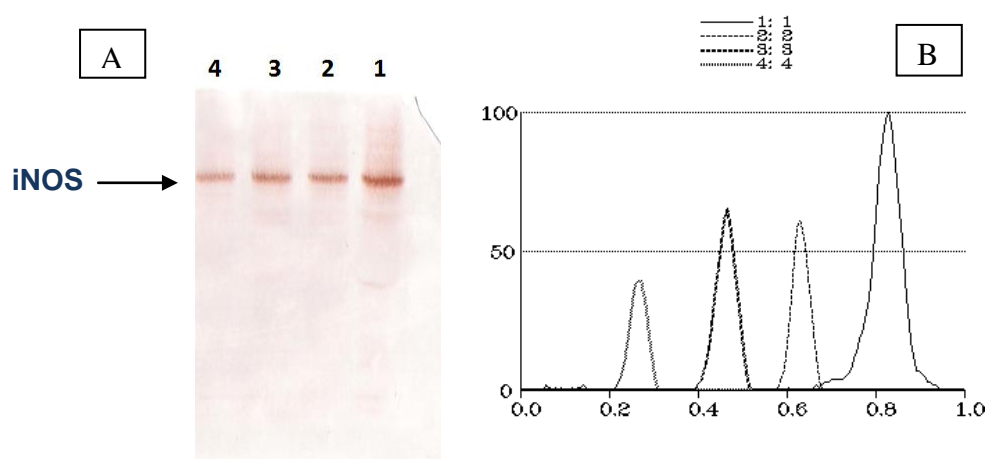


Figura 20 Expressão da iNOS. **A:** Detecção da óxido nítrico sintase induzida em cultura de macrófagos em diferentes situações por 6h. 1: Macrófagos ativado (controle); 2: Macrófago ativado e infectado com *Toxoplasma gondii* 6h; 3: Macrófago ativado, tratado com lactocistina e infectado com *T. gondii*, 4: Macrófago ativado, tratado com calpeptina e infectado com *T. gondii*. **B:** Densitometria óptica da figura A; n=3.

Quando o proteossomo é inibido, a iNOS é direcionada para via do agrossomo para sua degradação. A **figura 21** mostra o agregado de iNOS na região perinuclear. Esse agregado é direcionado através da via do agrossomo ao lisossomo para sua degradação. Por isso, não observamos a expressão da iNOS e sua produção de NO no tratamento com lactocistina, macrófago ativado (**Figura 14 e Figura 20**).

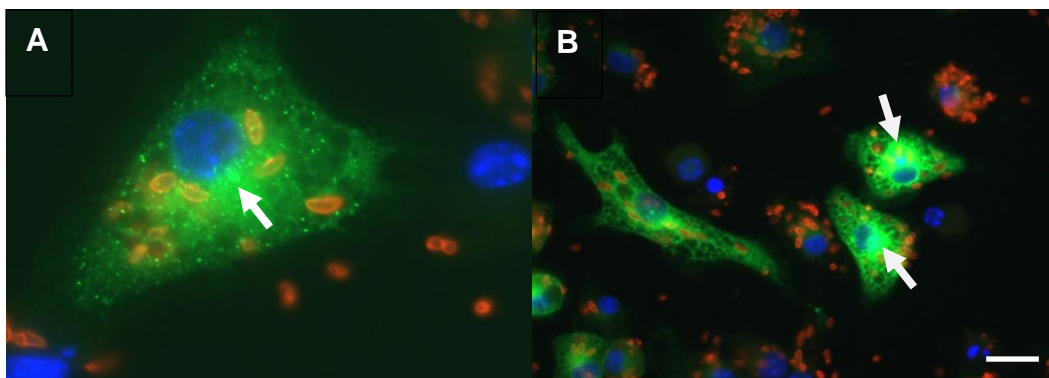


Figura 21. Agrossomo (seta). Macrófago ativado, tratado com inibidor de proteossomo, lactocistina, e infectado com *T. gondii* por 6 h, **A:** Aumento de 100x e **B:** Aumento de 40x. Barra: 10 μ m. n=3.

Proteínas para serem degradadas via proteossomo precisam ser previamente ubiquitinadas. A figura 19 mostra a localização de iNOS e de ubiquitina em macrófagos ativados e infectados por *T. gondii*. Macrófagos ativados apresentam iNOS e pouca marcação para ubiquitina (**Figura 22 A-C**). Quando infectados, os macrófagos apresentam ubiquitinação da iNOS (**Figura 22 D-G**). Quando os macrófagos são tratados com lactocistina a iNOS continua expressa e o sinal de fluorescência para ubiquitina é maior (**Figura 22 H-K**) que quando lactocistina é utilizada e o macrófago não é infectado (**Figura 22 L-O**). Esses dados indicam que a infecção por *T. gondii* faz com que a iNOS seja ubiquitinada antes de ser enviada para degradação via proteossomo. Quando tratada com lactocistina inibindo o proteossomo, ainda observamos iNOS ubiquitinada, o que explica o aumento de sinal para ubiquitina (**Figura 22 I**). Esses dados ainda são preliminares e serão confirmados incluindo análise com tempos maiores de infecção.

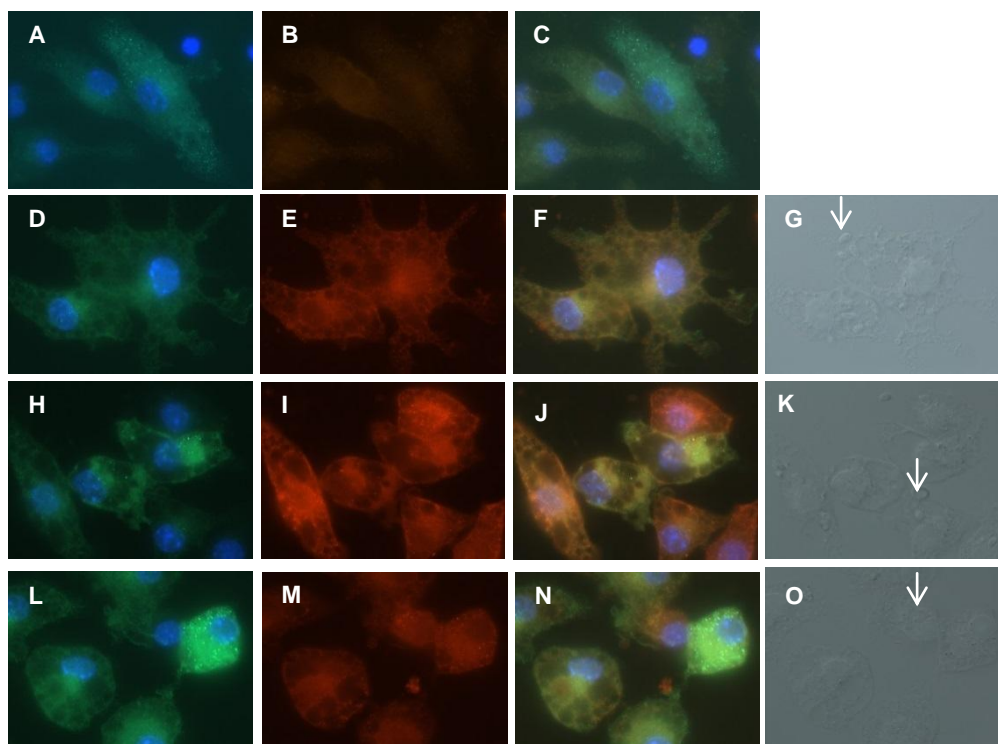


Figura 22: Expressão iNOS (verde), ubiquitina (vermelho), localização de parasitas (DIC - seta) e núcleo (azul) de macrófagos (MØ) ativados e infectados por 2 h com *Toxoplasma gondii* e tratados com lactocistina. A, B, C: MØ ativados, alta expressão da iNOS e baixa da ubiquitina. D, E, F, G: MØ ativado e infectado com *T. gondii* por 2h, iNOS ubiquitinada. H, I, J, K: MØ ativados, tratados com lactocistina e infectados com *T. gondii* por 2h, iNOS ubiquitinada. L, M, N, O: MØ ativados, tratados com lactocistina por 2h, iNOS ubiquitinada. . Barra: 10µm. n=3.

7 DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma doença de grande abrangência mundial que tem a capacidade de infectar uma variedade de animais, inclusive o homem e cujo agente etiológico é *Toxoplasma gondii*. A prevalência da infecção por *T. gondii* em humanos é alta, sendo que pesquisas demonstram estimativas de infecção crônica em indivíduos adultos variando de 10% a 90%, sendo que um terço da população adulta dos Estados Unidos da América e mais de 85% dos franceses apresentam sorologia positiva para a toxoplasmose. No Brasil, estudos epidemiológicos revelaram que 90% dos animais domésticos e silvestres avaliados apresentam anticorpos para o protozoário (DUBEY et al., 2012). A prevalência é significativamente alta na América Latina, onde foram detectados índices de 51 a 72%. Já no continente africano, são achados intervalos entre 54 a 77%, e no sul da Ásia, de 4% e 39% (TENTER et al., 2000). No Brasil, a infecção por *T. gondii* é amplamente prevalente em humanos, sendo que 50% das crianças e 80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos que reconhecem esse protozoário (DUBEY et al., 2012). A enfermidade de ocorrência mundial também se encontra amplamente difundida entre as diversas espécies de animais de interesse econômico, tais como os suínos, ovinos, caprinos, bem como os carnívoros e roedores (Costa, 2013), todos esses animais são potencialmente transmissores de *T. gondii* para o homem. Embora a infecção toxoplásmica se apresente em taxas elevadas entre os animais e o homem, a taxa de morbidade costuma ser baixa, com maior gravidade para fêmeas prenhes, neonatas e imunodeprimidas (Costa, 2013).

Por ser um agente causador de zoonose e por seus impactos à Saúde Pública, *T. gondii* tem sido o mais estudado, dentre os coccídios (TENTER et al., 2000). A falta de condições sanitárias adequadas expõe a população a uma variedade de doenças, dentre as quais a toxoplasmose destaca-se nos países em desenvolvimento, onde a elevada soropositividade para *T. gondii* é mais comum entre as pessoas de baixo grupo socioeconômico (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

Assim, o impacto sócio-econômico da toxoplasmose é elevado, devido à gravidade dos quadros nos diversos tipos de hospedeiros, complicações

associadas, tratamento e os custos sociais, sendo importante o estudo e aprofundamento de conhecimentos sobre o parasito causador da doença, *T. gondii*, para melhor entender e tratar a toxoplasmose.

Macrófagos são células do sistema imune e produzem NO como agente microbicida. O nosso grupo de pesquisa tem trabalhado por muitos anos com estudos que envolvem a interação entre parasitos e hospedeiros. E em estudos com o parasito intracelular obrigatório *T. gondii*, tem sido demonstrado que esse é capaz de bular o mecanismo microbicida dos macrófagos ativados, já que se observa inibição da produção de NO através do desaparecimento da iNOS após a infecção (SEABRA *et al.*, 2002; 2004; GUILLERMO & DAMATTA 2004). Para o desenvolvimento de novas terapias contra este parasito é importante entender qual o mecanismo acionado pela infecção que leva ao desaparecimento da iNOS. Por isso, o trabalho de Seabra *et al.* de 2002 nos conduziram ao questionamento e objetivo deste trabalho, buscando entender na linhagem de macrófagos J774-A1 qual a possível via de degradação da iNOS: proteossomo, calpaína ou lisossomo na infecção por *T. gondii*. Para tal, foram usados inibidores farmacológicos específicos para cada via. E finalmente podemos concluir uma série de questionamentos que envolviam a infecção por *T. gondii* e demonstrar que a infecção de *T. gondii* inibe a produção de NO e que o desaparecimento da iNOS acontece via proteossomo.

Alteração da produção de NO leva a muitas desordens fisiopatológicas, pois esse gás participa de muitas vias fisiológicas, em várias regulações e funções de diversos organismos (Ignarro, 2000). Muita atenção deve ser dada ao estudo das isoformas de NOS, devido à importância do NO na sinalização celular. Estudar a regulação e degradação da iNOS é conhecer melhores formas de controle da atividade celular em situações adversas, como em inflamações estéreis ou infecciosas. Para o nosso trabalho em especial, a iNOS é de extrema importância, pois participa do processo de ativação dos macrófagos, que torna estas células mais microbidas. Existem vários estudos e publicações sobre a biossíntese do NO, transporte, mecanismos de transdução, envolvimento em doenças neurodegenerativas etc (Kolodziejcki *et al.*, 2002; Feng, 2012), mas existe pouca literatura científica relacionadas à regulação e principalmente à degradação da iNOS. Sendo assim, nosso trabalho contribui de forma significativa para a literatura científica, pois além de

estudar a degradação da iNOS, também relaciona esta enzima com uma infecção, ou seja, também se torna um estudo importante para a medicina e saúde em geral.

A iNOS é primeiramente regulada a nível transcripcional, porém tem sido descritas proteínas que interagem com a iNOS. Inibidores seletivos de NOS para iNOS são raros, comumente exibem seletividade limitada ou significativa toxicidade. Porém, quinazolina e aminopiridina são potentes e seletivos para iNOS *in vitro* (Garcin *et al.*, 2008). É um desafio projetar inibidores seletivos para as isoformas de NOS, devido à conservação de sítios ativos entre elas. Utilizar um inibidor não seletivo, por exemplo, no caso de doenças neurológicas, quando se tem alta expressão de nNOS, diminui também a expressão e atividade da eNOS que é responsável pelo controle da pressão arterial (Feng, 2012). O mesmo pode ocorrer na tentativa de controle da iNOS quando induzida na infecção. Por isso, o estudo da regulação dos mecanismos moleculares da iNOS é de suma importância, visto que pode ser chave para o desenvolvimento de novos fármacos seletivos para o tratamento de uma ampla gama de doenças que ainda não tem terapia efetiva (Feng, 2012).

Tem sido demonstrado que a iNOS é regulada e pode desaparecer por três vias principais: as vias calpaína, lisossomo e ubiquitina-proteossomo (Musial and Eissa, 2001; Kone *et al.*, 2003). Com a infecção, uma dessas vias deve ser amplificada, degradando a iNOS e conseqüentemente diminuindo a produção de NO. A hipótese deste trabalho é que a iNOS é desativada após a infecção de *T. gondii* pela ativação da via do proteossomo, baseado em estudos envolvendo a degradação da iNOS (MUSIAL & EISSA, 2001, KOLODZIEJSKI *et al.*, 2002). Nosso trabalho foi realizado com macrófagos da linhagem J774-A1 e nestas células também se confirmou que após a infecção de *T. gondii*, a produção de NO é inibida. Este resultado indica que *T. gondii* é capaz de inibir a produção de NO em todas as linhagens testadas até o momento. Quando a iNOS dos macrófagos infectados com *T. gondii* foi revelada por imunofluorescência constatamos que a enzima desapareceu no citoplasma somente das células infectadas. Quando os macrófagos não foram infectados, a expressão da iNOS foi clara. Esse resultado também nos indica que na infecção, a produção de NO diminui porque a iNOS desaparece do

citoplasma dos macrófagos, ou seja, está sendo degradada e não pode mais catalisar a reação de produção de NO.

Para testificar nossa hipótese, fizemos um modelo de experimentos baseado na inibição de vias de degradação celular, vias essas que tem sido descritas na literatura como responsáveis pela degradação da iNOS (MUSIAL & EISSA, 2001, KOLODZIEJSKI et al., 2002). Neste modelo, macrófagos tiveram as vias do proteossomo, da calpaína e do lisossomo inibidas em culturas diferentes, porém em ensaios paralelos. A partir desse modelo tínhamos as perguntas para serem respondidas ou confirmadas com base nas nossas hipóteses. Inibindo as vias do proteossomo, calpaína ou lisossomo, a iNOS no citoplasma dos macrófagos infectados por *T. gondii* desapareceria? Os resultados esperados eram: iNOS desapareceria do citoplasma, continuaria sendo degradada por outra via ou iNOS permaneceria no citoplasma após inibição da via, permitindo concluir a via de degradação da iNOS (**Figura 23**).

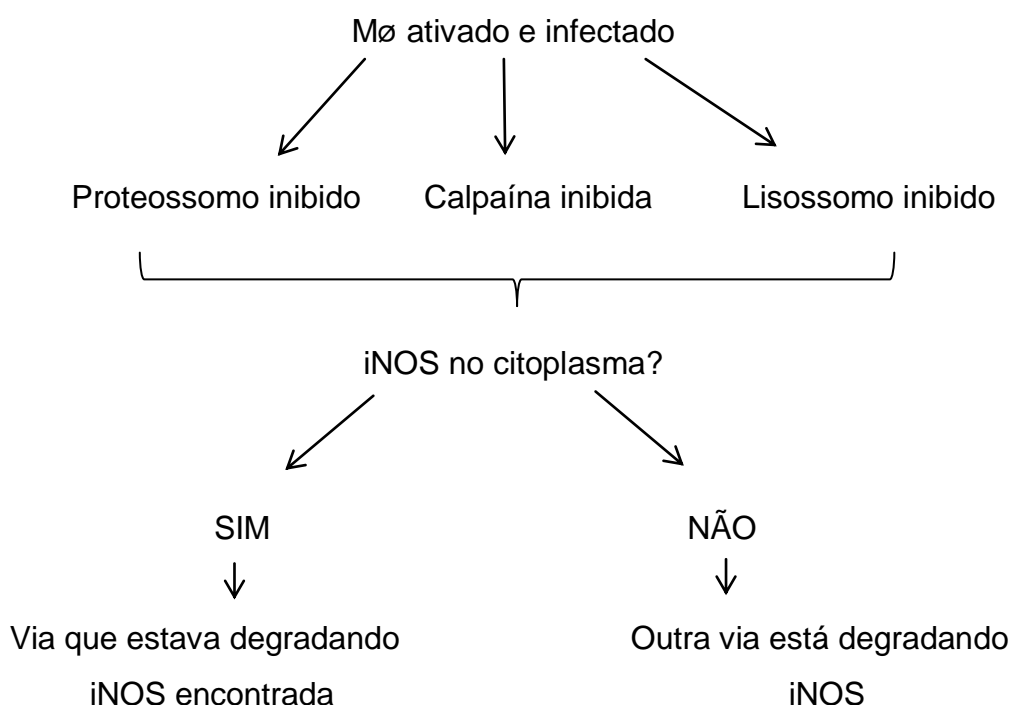


Figura 23: Modelo de experimentação para detectar a via de degradação da iNOS, utilizando inibidores específicos para cada uma das vias .

Quando os macrófagos foram tratados com lactocistina, droga que inibe a via do proteossomo, a expressão da iNOS continuou sendo detectada no

citoplasma dos macrófagos infectados. Ou seja, a via que degradava a iNOS na infecção era a do proteossomo e quando este foi farmacologicamente inibido, a iNOS não foi degradada e permaneceu no citoplasma dos macrófagos. Isso se confirma, pois mesmo bastante infectados, os macrófagos apareceram bem marcados pela fluorescência, indicando a presença da iNOS. Da mesma forma, estas células tratadas com o inibidor de proteossomo lactocistina continuaram a produzir NO, mostrando atividade da enzima.

A ubiquitinação é uma marcação de proteínas para sua posterior degradação via proteossomo. A cadeia de ubiquitina é reconhecida por receptores no proteossomo e, assim, as proteínas são transportadas para serem degradadas (VOGES et al., 1999). Demonstramos também que a iNOS está sendo ubiquitinada antes de ser degradada no processo de infecção de *T. gondii* em macrófagos ativados. Nesses macrófagos infectados, o parasito burla o sistema imunológico e inibe o mecanismo microbicida dessas células degradando a iNOS, que é responsável pela produção do agente microbicida NO. A confirmação que esses macrófagos estão sendo ubiquitinados antes da sua degradação reforça a hipótese de que a iNOS está sendo degradada via proteossomo, visto que a ubiquitinação é um mecanismo natural da célula para degradação de proteínas intracelulares por essa via.

Porém, quando os macrófagos foram tratados com calpeptina, droga que inibe a via da calpaína, a expressão da iNOS não foi detectada no citoplasma dos macrófagos infectados. Este resultado sugere que a calpaína não está participando da degradação da iNOS na infecção por *T. gondii* em macrófagos ativados, pois após a infecção a degradação da iNOS continuou ocorrendo, independente da calpaína que estava inibida farmacologicamente. A via de degradação da iNOS não foi inibida devido ao tratamento com essa droga, pois quando infectado os macrófagos não aparecem marcados e revelados pela fluorescência, indicando a ausência da iNOS no citoplasma dessas células, e sugerindo que a iNOS continua sendo degradada com essa via inibida. O resultado se confirmou com a dosagem de NO dos macrófagos, pois permaneceu menor do que a dosagem de NO de macrófagos ativados sem a infecção (controle). Como a iNOS continuava sendo degradada, não havia enzima para promover a catálise da reação de produção de NO, logo esse valor total de NO celular reduziu.

O mesmo resultado obteve-se quando os macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* foram tratados com concanamomicina A, inibidor da via dos lisossomos. Com os lisossomos inibidos, a iNOS não foi marcada por fluorescência no citoplasma dos macrófagos, ou seja, continuou sendo degradada, como mecanismo de escape do parasito por outra via; a produção de NO também confirmou esse resultado, pois manteve-se inibida com a infecção.

Para confirmarmos os resultados obtidos com a imunofluorescência e a dosagem de NO, foi realizada a detecção da iNOS por western blotting seguindo o mesmo modelo de experimentação, com culturas com drogas para inibição das respectivas vias para detecção da responsável pela degradação da iNOS. O western blotting confirmou os resultados anteriores permitindo concluir que a iNOS está sendo degradada pela via do proteossomo. A iNOS foi detectada em macrófagos infectados e tratados pela lactocistina e sua expressão foi maior quando só havia infecção sem inibição das vias e também maior do que quando a via da calpaína foi inibida. O ensaio com inibição de lisossomo não foi realizado para os experimentos com western blotting. Macrófagos ativados sem infecção apresentaram a expressão mais forte de iNOS que os infectados com *T. gondii*. Este resultado indica claramente que a via da calpaína não está sendo ativada pela infecção de *T. gondii*.

Porém, é possível observar que a expressão da iNOS não é a mesma quando tratada com lactocistina e comparada com macrófagos não infectados. Macrófagos ativados e não infectados expressam mais iNOS. Isso pode estar acontecendo porque no tempo de tratamento utilizado, a iNOS já pode estar sendo recrutada para formar agrossomos, sendo um novo mecanismo de escape acionado pelo parasito para continuar degradando a iNOS. Porém, com a confirmação da densitometria óptica e com os resultados da imunofluorescência mostrando que a iNOS permanece no citoplasma de macrófagos infectados e tratados com lactocistina, é possível afirmar que o proteossomo está envolvido na degradação da iNOS de macrófagos infectados com *T. gondii* e que a via da calpaína e lisossomos não estão relacionadas com a degradação da iNOS, já que macrófagos expressam menos a iNOS na infecção e tratamento com calpeptina e concanamomicina.

Os agrossomos são corpos de inclusão citoplasmática formados em situações de estresse celular e também é descrito como um “mecanismo fisiológico” para regular algumas proteínas celulares, capaz de controlar a atividade da iNOS pelo direcionamento para sua degradação, formando um agregado de iNOS na região perinuclear e direcionando esse agregado pra degradação via autofagia (Kolodziejska *et al.*, 2005).

O resultado do western blotting permitiu formular uma nova hipótese: a iNOS poderia estar formando um agregado para ser degradada por autofagia quando o proteossomo foi inibido. Para testar essa hipótese, verificamos se ocorria formação de agregados de iNOS na região perinuclear dos macrófagos após ativação, inibição da via do proteossomo e infecção por *T. gondii*. Demonstramos que, também em macrófagos infectados, quando o proteossomo é inibido, a iNOS é encontrada em um agregado na região perinuclear desses macrófagos, sugerindo que a via do agrossomo participe de sua possível degradação.

A **figura 24** sumariza os resultados obtidos, mostrando que para a conclusão da descoberta da via de degradação da iNOS foram realizados diferentes tratamentos de inibição de vias diferentes de degradação e que somente com a inibição do proteossomo via lactocistina, a iNOS permaneceu ativa.

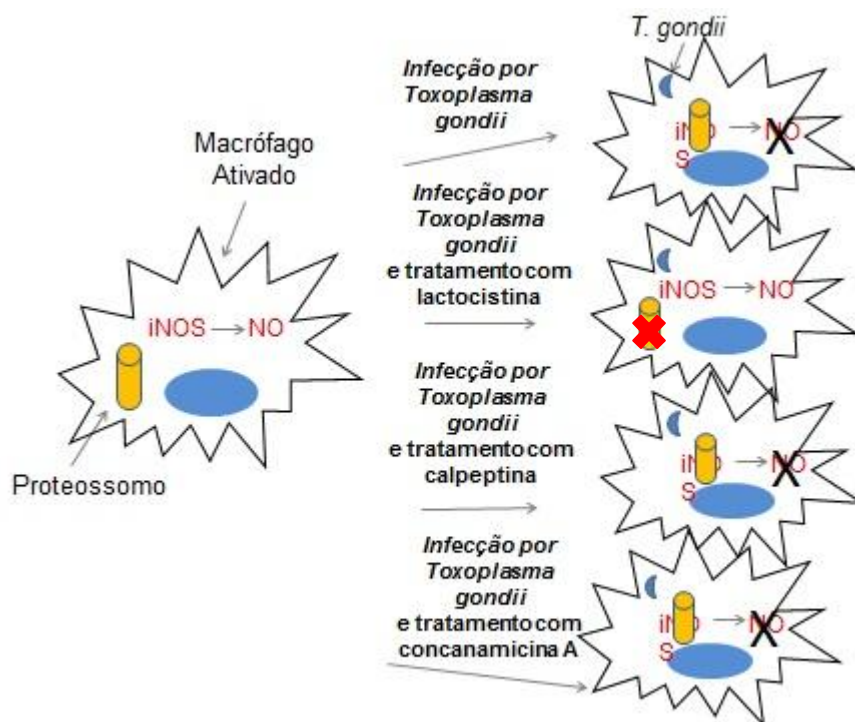


Figura 24: Esquema resultados obtidos, mostrando que a iNOS permanece ativa no tratamento com lactocistina, que é quando o proteossomo está inativo.

Conhecer os mecanismos utilizados pelo sistema imunológico em uma infecção, a ação do parasito na infecção e a resposta imunológica frente a essa infecção é importante para se determinar todo um ciclo de uma doença e, a partir daí, criar estratégias para tratar e erradicar as doenças. Este trabalho contribui para este fim, visto que descobriu a via responsável pela degradação da iNOS na infecção, via essa que é, possivelmente, um mecanismo utilizado pelo parasito para burlar a resposta imune, persistir na célula e propagar a infecção. Esse resultado também foi importante para dar continuidade as pesquisas que agora irão realcionar os resultados obtidos com a experimentação *in vivo*, onde camundongos terão o proteossomo inibido e serão infectados e posteriormente observados para análises da virulência e suas consequências. Investigar os mecanismos utilizados pelo parasita para burlar o sistema imune é essencialmente importante e útil para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas, já que a toxoplasmose é uma doença que infecta um terço da população mundial (Hunter *et al.*, 1994; Bhopale 2003; Rozenfeld *et al.*, 2005).

8 CONCLUSÃO

Podemos concluir que macrófagos ativados infectados por *T. gondii* tratados com lactocistina tem o proteossomo inativado e apresentam a expressão da iNOS no citoplasma, indicando que a via de degradação da iNOS após a infecção por *T. gondii* é a do proteossomo. Houve formação de agregado de iNOS, sugerindo a formação do agrossomo para possível degradação de iNOS via autofagia.

Concluimos também que a via da calpaína e do lisossomo não participam da degradação da iNOS após a infecção por *T. gondii*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SOUD, HM, STUENHR DJ. **Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer.** Proc Natl Acad Sci U S A, 90: 10769-10772, 1993.
- ADAMS, D. O. & HAMILTON, T. A. **The cell biology of macrophage activation.** Ann. Rev. Immunol. v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADAMS LB, HIBBS JB, TAINTOR RR, KRAHENBUHL JL. **Microbiostatic effect of murine- activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine.** J Immunol. v. 4, p. 2725–2729, 1990.
- ADAMS, D. O. **Molecular biology of macrophage activation: a pathway whereby psychosocial factors can potentially affect health.** Psychosom. Med. v. 56, p. 316-327, 1994.
- AKTAN, F. **iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.** Life Sci, 75: 639-653, 2004.
- ALDERTON, WK, COOPER, CE, KNOWLES, RG. **Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition.** Biochem J, 357: 593-615, 2001.
- 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 v. 1, p. 17, 2005.
- AMBROISE-THOMAS, P, PELLOUX, H. **Toxoplasmosis—congenital and in immunocompromised patients: a parallel.** Parasitol Today. v. 9, p.61–63, 1993.
- ASHCROFT, G. S. **Bidirectional regulation of macrophages function by TGF-beta.** Microbes Infect. v. 1, p. 1275-1282, 1999.
- AUGER, M. J. & ROSS, J. A. **The biology of the macrophage.** The Macrophage. (C. E. Lewis and J. O'D. McGee, eds) IRL Press, New York, NY. P. 1-74, 1992.
- BERMUDEZ, L. E., COVARO, G., REMINGTON, J. **Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of**

- transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors.** Infect. Immun. v. 61, p. 4126-4130, 1993.
- BIRD PI, TRAPANI JA, VILLADANGOS JA. **Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity.** Nat Rev Immunol. 9: 871-882, 2009.
- BHOPALE, G.M. **Pathogenesis of toxoplasmosis.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. v. 26, p. 213–222, 2003.
- BOGDAN ,C, NATHAN, C. **Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10.** Ann N Y Acad Sci v. 685, p.713–739, 1993.
- BONTA, I. L., PARNHAM, M. J. **Prostaglandins and chronic inflammation.** Biochem Pharmacol. v. 27, p. 1611-1623, 1978.
- BUTCHER, B. A., KIM, L., JOHNSON, P. F., DENKERS, E. Y. ***Toxoplasma gondii* tachzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B.** J. Immunol. v. 167, p. 2193-2201, 2001.
- BUTCHER, B.A., KIM, L., PANOPOULOS, A.D., WATOWICH, S.S., MURRAY, P.J., DENKERS, E.Y. **IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediate suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages.** J. Immunol. v. 174, p. 3148–3152, 2005.
- CARDINALE A, FILESI I, BIOCCA S. **Aggresome formation by anti- Ras intracellular scFv fragments: the fate of the antigen-antibody complex.** Eur. J. Biochem. 268: 268-277, 2001.
- CARRUTHERS, V. B. **Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*.** Acta Trop. v. 81, p. 111-122, 2002.
- CHAKRAVARTI, R, AULAK, K, FOX, P, STUEHR, DJ. **GAPDH regulates cellular heme insertion into inducible nitric oxide synthase.** Proc Natl Acad Sci U S A, 107: 18004-18009, 2010.
- CIECHANOVER, A. **Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome.** Nat Rev Mol Cell Biol. v. 6, p. 78-86, 2005.
- COSTA. RCB. **Aspéctos epidemiológicos e importância da toxoplasmose na sanidade animal e na saúde pública.** Goiania, 2013.
- DAMATTA, R. A., MANHAES, DS. L., SEABRA, S. H., DE SOUZA, W. **Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding.** Bio Cell. v. 22, p. 45-52, 1998.

- DAMATTA RA, SEABRA SH, MANHÃES L, DE SOUZA W. **Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages.** Parasitol Res. v. 86, p. 239–243, 2000.
- DAMATTA, RA, SEABRA, SH, DEOLINDO, P, ARNHOLDT, AC, MANHÃES, L, GOLDENBERG, S, DE SOUZA, W. ***Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism.** FEMS Microbiol Lett, 266: 29-33, 2007.
- DARNELL, J. E., JR., KERR, I. M., STARK, G. R. **Jak-STAT pathway and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.** Science. v. 264, p. 1415-1421, 1994.
- DAVIS, RL, SANCHES, AC, LINDLEY, DJ, WILLIAMS, SC, SVAPIN, PJ. **Effects of mechanistically distinct NF-kappaB inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression.** Nitric Oxide. v. 12, p. 200-209, 2005.
- DE SERVI, B., LA PORTA, C.A., BONTEMPELLI, M., COMOLLI, R. **Decrease of TGF- β 1 plasma levels and increase of nitric oxide synthase activity in leukocytes as potential biomarkers of Alzheimer's disease.** Exp Gerontol. v. 37, p. 813–821, 2002.
- DEMARCHI, F. & SCHNEIDER, C. **The calpain system as a modulator of stress/damage response.** Cell Cycle. v. 6, p. 136-138, 2007.
- DENKERS, E. Y., GIAZZINELLI, R. T. **Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.** Clin Microbiol Rev. v. 11, p. 569-588, 1998.
- DOBBIN, C. A., SMITH, N. C., Johnson. **Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide.** J. Immunol. v. 169, p. 958-965, 2002.
- DUBEY, J. P., Toxoplasmosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. v. 189, p. 166-170, 1986.
- DEBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. **Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts.** Clin Microbiol Rev. v. 11, p. 267-299, 1998.

- DWEIK, RA, LASKOWSKI, D, ABU-SOUD, HM, KANEKO, FT, HUTTE,R, DENNIS J. STUEHR, DJ, ERZURUM, SC. **Nitric Oxide Synthesis in the Lung.** J Clin Invest, 101: 660-666, 1998.
- DUBREMETZ, J. F. **Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*.** Trends Microbiol. v. 27, p. 27-30, 1998.
- ELLIS NEYER, L, GRÜNING, G, FORT, M, REMINGTON, JS, RENNICK, D, HUNTER, CA. **Role of interleukin-10 in regulation of T-cell dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*.** Infect Immun. v. 65, p. 1675–1682, 1997.
- EL KASMI, KC, QUALLAS JE, PESCE JT, SMITH AM, THOMPSON RW, HENAO-TAMAYO, M., BASARABA, R. J., KÖNIG, T., SCHLEICHER, U., KOO, M. S., KAPLAN, G., FITZGERALD, K. A., TUOMANEN, E. L., ORME, I. M., KANNEGANTI, T. D., BOGDAN, C., WYNN, T. A., MURRAY, P. J. **Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens.** Nat Immunol 9: 1399–1406, 2008.
- ESKELINEN EL, TANAKA Y, SAFTIG P. **At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins.** Trends Cell Biol. 13: 137-145, 2003.
- ESKELINEN EL. **Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells.** Autophagy 1:1–10, 2005.
- FENG, C, DUPONT, AL, NAHM, NJ, SPRATT, DE, HAZZARD, JT, WEINBERG, JB, GUILLMENTTE, JG, TOLLIN, G, GHOSH, DK. **Intraprotein Electron Transfer in Inducible Nitric Oxide Synthase Holoenzyme.** J Biol Inorg Chem, 14: 133-142, 2009.
- FENG C. **Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions.** Coord Chem Rev, 256: 393–411, 2012.
- FERREIRA, MS, BORGES, AS. **Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients—a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 97, p.443–457, 2002.
- FORGAC M. **Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology.** Nat Rev Mol Cell Biol. 8: 917-929, 2007.

- FRENKEL, J.K., DUBEY, S.P., MILLER, N.L. ***Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as Coccidian oocysts.** Science. v. 167, p. 893-896, 1970.
- FUTERMAN AH, VAN MEER G. **The cell biology of lysosomal storage disorders.** Nat Rev Mol Cell Biol. 5: 554-565, 2004.
- GACHHUI, R, PRESTA, A, BENTLEY, DF, ADU-SOUD, HM, MCARTHUR, R, BRUDVING, G, GHOSH, DK, STUENHR, DJ. **Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Calmodulin response is complete within the reductase domain itself.** J Biol Chem, 271: 20594-20602, 1996.
- GAO, C., GUO, H., MI, Z., GRUSBY, M. J., KUO, P. C. **Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW264.7 murine macrophages.** J. Immunol. v. 178, p. 1870-1881, 2007.
- GACZYNSKA, M., OSMULSKI, P. A. **Methods in Mol Biol (Ubiquitin-Proteasome Protocols**, Editado por: C. Patterson and D. M. Cyr ©), 301, Humana Press Inc., Totowa, NJ., 2005.
- GARCIN, ED, ARVAI, AS, ROSENFELD, RJ, KROEGER, MD, CRANE, BR, ANDERSSON, G, ANDREWS, G, HAMLEY, PJ, MALLINDER, PR, NICHOLLS, DJ, ST-GALLAY, SA, TINKER, AC, GENSMANTEL, NP, METE, A, CHESHIRE, DR, CONNOLLY, S, STUEHR, DJ, ÅBERG, A, WALLACE, A V, TAINER, JA, GETZOFF, ED. **Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase.** Nat Chem Biol, 4: 700-707, 2008.
- GACHHUUI, R, PRESTA, A, BENTLEY, DF, ABU-SOUD, HM, MCARTHUR, R, BRUDVING, G, GHOSH, DK, STUEHR, DJ. **Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Calmodulin response is complete within the reductase domain itself.** J. Biol Chem, 271: 20594-20602, 1996.
- GAVRILESCU, L. C., BUTCHER, B. A., DEL RIO, L., TAYLOR, G. A., DENKERS, E. Y. **STAT1 is essential for antimicrobial effector function but dispensable for gamma Interferon production during *Toxoplasma gondii* infection.** Infect Immun. v. 72, p. 1257-1264, 2004.
- GAZZINELLI, RT, HIENY, S, WYNN, TA, WOLF, S, SHER, A. **Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon- γ by**

- an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.** Proc Natl Acad Sci USA. v. 90, p. 6115–6119, 1993.
- GAZZINELLI, RT, AMICHAY, D, SCHARTON-KERSTEN, T, GRUNWALD, E, FARBER, JM, SHER, A. **Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*.** Curr Top Microbiol Immunol. v. 219, p.127–139, 1996.
- GELLER, DA, BLLIAR, TR. **Molecular biology of nitric oxide synthases.** Cancer Metastasis Rev, 17: 7-23, 1998.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., AND CONG, J. **The calpain system.** Physiol Rev. v. 83, p. 731-801, 2003.
- GORDON S. **Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response.** Cell. v. 111, p. 927–30, 2002.
- GORDON, S. **Alternative activation of macrophages.** Nat Rev Immunol. v. 3, p. 23-35 2003a.
- GORDON S. **Macrophages and the immune response.** Fundamental Immunology, ed. W Paul, p. 481–95, 2003b.
- GREEN L. C., D. A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P. L. SKIPPER, J. S. WISHMOK, S. R. TANNENBAUN. **Analyses of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrite in biological fluids.** Anal Biochem. v. 126, p. 131-138, 1982.
- GROVES, JT, WANG, CC-Y. Nitric Oxide Synthase: models and mechanisms. **Curr Opin Chem Biol**, 4: 687-95, 2000.
- GUILLERMO, L.V., DAMATTA, R.A. **Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophages cell lines.** Poult Sci. v.83, p. 776-782, 2004.
- HALONEN, SK, CHIU, F, WEISS, LM. **Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes.** Infect Immun. 66: 4989-4993, 1998.
- HESSE, M., MODOLELL, M., LA FLAMME, A.C., SCHITO, M., FUENTES, J.M., CHEEVER AW, PEARCE, E.J., WYNN, T.A. **Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism.** J Immunol. v. 167, p. 6533–6544, 2001.
- HUME, D. A. **The mononuclear phagocyte system.** Curr Opin Immunol. v. 18, p. 49-53, 2006.

- HUNTER CA, LITTON MJ, REMINGTON JS, ABRAMS JS. **Immunocytochemical detection of cytokines in the lymph nodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis.** J Infect Dis. v. 170, p. 939–945, 1994.
- HUYNH, M. L., FADOK, V. A., HENSON, P. M. **Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta 1 secretion and the resolution of inflammation.** J. Clin. Invest. v. 109, p. 41-50, 2002.
- HURSHMAN, AR, MARLETTA, M. **Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity.** Biochemistry, 34: 5627-5634, 1995.
- JOINER, KA, FUHRMAN, SA, MIETTINEN, HM, KASPER, LH, MELLMAN, I. ***Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts.** Science. v. 249, p. 641–646, 1990.
- JONES, T. C., HIRSCH, J. G. **The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites.** J. Exp. Med. v. 136, p. 1173-1194, 1972.
- KAUFMANN SHE, MEDZHITOV R, GORDON S. **The Innate Immune Response to Infection.** DC:ASM, p. 465, 2004.
- KIM, L., BUTCHER, B.A., DENKERS, E.Y. ***Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance.** J. Immunol. v. 172, p. 3003–3010, 2004.
- KLIONSKY DJ. **Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade.** Nat Rev Mol Cell Biol 8: 931–937, 2007.
- KLOETZE, PM. **The proteasome and MHC class I antigen processing.** Biochim Biophys Acta 1695: 225-233, 2004.
- KNOWLES, RG, MONCADA, S. **Nitric oxide synthases in mammals.** Biochem J, 298: 249 - 258, 1994.
- KNOWLTON, J. R.,JOHNSTON, S. C., WHITBY, F. G., REALINI, C., ZHANG, Z., RECHSTEINER, M., HILL, C. P. **Structure of the proteasome activator REGa (PA28a).** Nature. v. 390, p. 639-643, 1997.

- KNUDSEN, GM, NISHIDA, CR, MOONEY, SD, ORTIZ DE MONTELLANO, PR. **Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity.** J Biol Chem, 278: 31814-31824, 2003.
- KOŁODZIEJSKI, P.J., MUSIAL, A., KOO, J.S., EISSA, N.T. **Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation.** Proc Natl Acad Sci USA. v. 99, p. 12315-12320, 2002.
- KONE, B.C., KUNCEWICZ, T., ZHANG, W., YU, Z. **Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide.** Am J Physiol Renal Physiol. v. 285, p. F178-F190, 2003.
- KROEMER G, JÄÄTTELÄ M. **Lysosomes and autophagy in cell death control.** Nat Rev Cancer. 5: 886-897, 2005.
- KUANG, Z, LEWIS, RS, CURTIS, JM, ZHAN, Y, SAUNDERS, BM, BABON, JJ, KOLESNIK, TB, LOW, A, MASTERS, SL, WILLSON, TA, KEDZIERSKI, L, YAO, S, HANDMAN, E, NORTON, RS, NICHOLSON, S. E. **The SPRY domain-containing SOCS box protein SPSB2 targets iNOS for proteasomal degradation.** J Cell Biol, 190: 129-141, 2010.
- LANG, C., GROß, U., LÜDER, C. G. K. **Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*.** Parasitol Res. v. 100, p. 191–203, 2007.
- LANGERMANS, JAM, NIBBERING, PH, VAN VUREN-VAN DER HULST, MEB, VAN FURTH, R. **Transforming growth factor- β suppresses interferon- γ -induced toxoplasma static activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor- α production.** Parasite Immunol. v.23, p. 169–175, 2001.
- LEVINE B, KLIONSKY DJ. **Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy.** Dev Cell. 6: 463-477, 2004.
- LI, W, FAN, W, ELMORE, BO, FENG, C. **Effect of solution viscosity on intraprotein electron transfer between the FMN and heme domains in inducible nitric oxide synthase.** FEBS Lett, 585: 2622-2626, 2011.
- LI, Z, ZHAO, Z, ZHU, X, REN, Q, NIE, F, GAO, J, GAO, X, YANG, T, ZHOU, W, SHEN, J, WANG, Y, LU, F, CHEN, X, HIDE, G, AYALA, FJ, LUN, Z.

- Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rat are responsible for the resistance against *T. gondii* infection.** PLoS One, 7: 35834, 2012.
- LIENDO, A & JOINER, KA. **Toxoplasma gondii: conserved protein machinery in an unusual secretory pathway?** Microbes Infect. 2: 137-144, 2000.
- LINGELBACH, K, JOINER, KA. **The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells.** J Cell Sci. v. 111, p. 1467–1475, 1998.
- LIU, X-D, MAZUMDAR, T, XU, Y, GETZOFF, ED., EISSA, NT. **Identification of a Flavin Mononucleotide Module Residue Critical for Activity of Inducible Nitrite Oxide Synthase.** Immunol, 183:5977-5982, 2009.
- LOWENSTEIN, C. J. & PADALKO, E. **iNOS (NOS2) at a glance.** J Cell Sci. v. 117, p. 2865-2867, 2004.
- LÜDER, CG, STANWAY, RR, CHAUSSEPIED, M, LANGSLEY, G, HEUSSLER, VT. **Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification.** Int J Parasitol. v. 39, p. 163- 173, 2009.
- MACMICKING, J.D., NATHAN, C., HOM, G., CHARTRAIN, N., FLETCHER, D.S, TRUMBAUER, M., STEVENS, K., XIE, Q.W., SOKOL, K., HUTCHINSON, N., CHEN, H., MUDGETT, J.S. **Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase.** Cell. v. 81, p. 641–650, 1995.
- MARSH M, SCHMID S, KERN H, HARMS E, MALE P, MELLMAN I, HELENIUS. **A Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free Xow electrophoresis.** J Cell Biol 104: 875-886, 1987.
- MARSHANSKY V, FUTAI M. **The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function.** Curr Opin Cell Biol. 20: 415-426, 2008.
- MAXFIELD FR, YAMASHIRO DJ. **Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis.** Adv Exp Med Biol. 225: 189-198, 1987.
- MCKEE, AS, DZIERSZINSKI, F, BOES, M, ROOS, DS, PEARCE, EJ. **Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*.** J Immunol. v. 173, p. 2632–2640, 2004.

- MELLGREN, R. L., ZHANG, W., MIYAKE, K., MCNEIL, P. L. **Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane.** J Biol Chem. v. 282, p. 2567-2575, 2006.
- MESSNER, S, LEITNER, S, BOMMASSAR, C, GOLDERER, G, GRÖBNER, P, WERNER, ER, WERNER-FELMAYER, G. **Physarum nitric oxide synthases: genomic structures and enzymology of recombinant proteins.** Biochem J, 418: 691-700, 2009.
- MOHAMED MM, SLOANE BF. **Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer.** Nat Rev Cancer. 6: 764-775, 2006.
- MORDUE, DG, DESAI, N, DUSTIN, M, SIBLEY, LD. **Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring.** J. Exp. Med. v. 190, p. 1783–1792, 1999.
- MOSSER, D.M & EDWARDS, J.P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** Nat Rev Immunol. v. 8, p. 958-969, 2008.
- MUSIAL, A. & EISSA, T. **Inducible Nitric-oxide Synthase is regulated by the Proteasome Degradation Pathway.** J. Biol Chem. v. 26, p. 24268-24273, 2001.
- NAGPAL, L, HAQUE, MM, SAHA, A, MUKHERJEE, N, GHOSH, A, RANU, BC, STUEHR, DJ, PANDA, K. Mechanism of Inducible Nitric-Oxide Synthase Dimerization Inhibition by Novel Pyrimidine Imidazoles. **Biol. Chem**, 288: 19685-19697, 2013.
- NATHAN, C. **Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make?** J Clin Invest, 100: 2417-2423, 1997.
- NATHAN, C. & SHILOH, M. U. **Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts microbial pathogens.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA . v. 97, p. 8841-8848, 2000.
- NIXON RA. **Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases.** Neurobiol Aging. 26: 373-382, 2005.
- PANDIT, L, KOLODZIEJSKA KE, ZENG S, EISSA NT. The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106: 1211-1215, 2009.

- PETERSEN E. **Toxoplasmosis. Semin Fetal Neonatal. Med.** v. 12, p. 214–223, 2007.
- PINES, J., LINDON, C. **Proteolysis: anytime, any place, anywhere?** Nat Cell Biol. v. 7, p. 731-735, 2005.
- REIS E SOUSA, C, HIENY, S, SCHARTON-KERSTEN, T, JANKOVIC, D, CHAREST, H, GERMAIN, RN, SHER, A. ***In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas.** J Exp Med. v. 186, p. 1819–1829, 1997.
- ROBERTS, A.B., **TGF- β , signaling from receptors to the nucleus.** Microb. Infect. v. 1, p. 1265-1273, 1999.
- ROGERS, NE, IGNARRO, LJ. **Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine.** Biophys Res Commun, 189: 242-249, 1992.
- ROZENFELD, C., MARTINEZ, R., SEABRA, S., SANT'ANNA, C., GONÇALVES, J.G., BOZZA, M., MOURA-NETO, V., DE SOUZA, W. ***Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia.** Am J Pathol. v.167, p. 1021-1031, 2005.
- SAEIJ, J.P., COLLIER, S., BOYLE, J.P., JEROME, M.E., WHITE, M.W., BOOTHROYD, J.C. ***Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue.** Nature, v. 445, p. 324–327, 2007.
- SAFTIG P, TANAKA Y, LULLMANN-RAUCH R, VON FIGURA K. **Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease.** Trends Mol Med. 7: 37-39, 2001.
- SANTOLONI, J, MEADE, AL, STUEHR, DJ. **Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II, and III.** J Biol Chem, 276: 48887-48898, 2001.
- SANTOS TA, PORTES JDE A, DAMASCENO-SÁ JC, CALDAS LA, SOUZA WD, DAMATTA RA, *et al.* **Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host.** PLoS One. v. 11, e: 27867, 2011.

- SASMONO, R. T., HUME, D. A. **The biology of macrophages**. The Innate Immune Response to Infection. S.Kaufmann, S.Gordon & R.Medzhitov. Eds. Am. Society for Microbiology Press. p. 71-94, 2004.
- SCHARTON-KERSTEN TM, WYNN TA, DENKERS EY, BALA S, GRUNVALD E, HIENY S, GAZZINELLI RT, SHER A. **In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection**. J Immunol. p. 4045-4054, 1996.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T., HUME, D. A. **Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions**. J Leukoc Biol. v. 75, p. 163-189, 2004.
- SEABRA, S.H., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. ***Toxoplasma gondii* inhibits nitric oxide production by activated mouse macrophages**. Exp. Parasitol. v. 100, p. 62-70, 2002.
- SEABRA, S.H., DAMATTA, R.A., DE SOUZA, W. ***Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β_1 autocrine effect orchestrating macrophages evasion**. Biochem Biophys Res Commun. v. 324, p. 744-752, 2004.
- SEMPOMBE, J, ELMORE, BO, SUN, X, DUPONT, A, GHOSH, DK, GUILLERMETTE, JG, KIRK, ML, FENG, C. **Mutations in the FMN Domain Modulate MCD Spectra of the Ferric Heme in the Oxygenase Domain of Inducible Nitric Oxide Synthase**. J Am Chem, 50: 6940-6941, 2009.
- SEMPOMBE, J, GALINATO, MGI, ELMORE, BO, FAN, W, GUILLEMETTE, JG, LEHNERT, N, KIRK, ML, FENG, C. **Mutation in the FMN Domain Modulates MCD Spectra of the iNOS Ferric Cyano Complex in a Substrate-Specific Manner**. Inorg Chem, 50: 6859-6861, 2011.
- SHA Y, PANDIT L, ZENG S, EISSA TN. **Critical Role for CHIP in the Aggresome Pathway**. Molecular and Cellular Biology. 29: 116–128, 2009.
- SHAPIRA, S., SPEIRS, K., GERSTEIN, A., CAAMANO, J., HUNTER, C. A. **Suppression of NF-kappa B activation by infection with *Toxoplasma gondii***. J. Infect. Dis. v. 185, p. 66-72, 2002.
- SHAPIRA, S., HARB, O.S., MARGARIT, J., MATRAJT, M., HAN, J., HOFFMANN, A., FREEDMAN, B., MAY, M.J., ROOS, D.S., HUNTER, C.A., 2005. **Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the**

- intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*.** Journal of Cell Science. v. 118, p. 3501–3508, 2005.
- SHER, A., OSWALD, I.P, HIENY, S., GAZZINELLI, R.T. ***Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha.** J. Immunol. v. 150, p. 3982–3989, 1993.
- SHERMAN, TS, CHEN, Z, YUHANNA, IS, LAU, KS, MARGRAF, LR, SHAUL, PW. **Nitric oxide synthase isoform expression in the developing lung epithelium.** Am J Physiol, 276: 383-390, 1999.
- SHIRATO, M, SAKAMOTO, T, UCHIDA, Y, NOMURA, A, ISHII, Y, IJIMA, H, GOTO, Y, HASEGAWA, S. **Molecular cloning and characterization of Ca²⁺-dependent inducible nitric oxide synthase from guinea-pig lung.** Biochem J, 333: 795-799, 1998.
- SIBLEY, L.D., WEIDNER, E., KRAHENBUHL, J.L. **Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*.** Nature. v. 315, p. 416–419, 1985.
- SIBLEY, L.D, ADAMS, L.B., FUKUTOMI, Y., KRAHENBUHL, J.L. **Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages.** J. Immunol. v. 147, p. 2340–2345, 1991.
- SIDDHANTA, U, PRESTA, A, FAN, B, WOLAN, D, ROUSSEAU, DL, STUEHR, DJ. **Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer.** J Biol Chem, 273: 18950-18958, 1998.
- STEVENS-TRUSS, R, MARLETTA, MA. **Interaction of calmodulin with the inducible murine macrophage nitric oxide synthase.** Biochemistry, 34: 15638-15645, 1995.
- STROBL, S, FERNANDEZ-CATALAN, C, BRAUN, M, HUBER, R, MASUMOTO, H, NAKAGAWA, K, IRIE, A, SORIMACHI, H, BOURENKOW, G, BARTUNIK, H, SUZUKI, K, BODE, W. **The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium.** Proc Natl Acad Sci USA, 97: 588-592, 2000.
- STUEHR,D.J., MARLETTA, M.A. **Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide.** Proc Natl Acad Sci U S A. v. 82, p. 7738-7742, 1985.

- STUEHR, DJ, GHOSH, S. **Enzymology of Nitric Oxide Synthases**. Nitric Oxide, Ed. Springer, 31-70, 2000.
- SUZUKI, Y, REMINGTON, JS. **Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice**. J. Immunol. v. 140, p. 3943–3946, 1988.
- TAYLOR, P.R., MARTINEZ-POMARES, L., STACEY, M., LIN, H-H, BROWN, G.D., GORDON, S. **Macrophage receptors and immune recognition**. Annu. Rev. Immunol. v. 23, p. 901: 944, 2005.
- TEJERO, J, SANTOLINE, J, STUEHR, DJ. **Fast Ferrous Heme-NO Oxidation in Nitric Oxide Synthases**. FEBS J. 276: 4505-4514, 2009.
- TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., WEISS, L. M. ***Toxoplasma gondii*: from animal to humans**. Int. J. Parasitol. v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- TSUNAWAKI, S., SPORN, M., DING, A., NATHAN, C. **Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta**. Nature. v. 334, p. 260-262, 1988.
- VAN MEEL E, KLUMPERMAN J. **Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system**. Histochem Cell Biol. 129: 253–266, 2008.
- VODOVOTZ, Y., BOGDAN, C., PAIK, J., XIE, Q. W., NATHAN, C. **Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta**. J. Exp. Med. v. 178, p. 605-613, 1993.
- VOGES, D., ZWICKL, P., BAUMEISTER, W. **The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis**. Annu. Rev. Biochem. v. 68, p. 1015-1068, 1999.
- WALKER G, PFEILSCHIFTER J, KUNZ D. **Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation**. J Biol Chem. v. 272, p. 16679–16687, 1997.
- WANG, ZQ, TEJERO, J, WEI, CC, HAQUE, MM, SANTOLINE, J, FADLALLA, M, BISWAS, A, STUEHR, DJ. **Arg375 tunes tetrahydrobiopterin functions and modulates catalysis by inducible nitric oxide synthase**. J Inorg Biochem 108: 203-215, 2012.

- WIGLEY WC, FABUNMI RP, LEE MG, MARINO CR, MUALLEM S, DEMARTINO GN, THOMAS PJ. **Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome.** J. Cell Biol. 145: 481-490, 1999.
- WILSON, C. B., TSAI, V., REMINGTON, J. S. **Failure to trigger the oxidative burst of normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens.** J. Exp. Med. v. 151, p. 328-346, 1980.
- XIAO, H, ZHOU, H, CHEN, G, LIU, S, LI, G. **Interaction between Inducible Nitric Oxide Synthase and Calmodulin in Ca²⁺-Free and -Bound Forms.** J Proteome Res, 6: 1426-1429, 2007.
- YAP, G.S. & SHER, A. **Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.** J. Exp. Med. v. 189, p. 1