

Ação da fosfatidilserina no processo de infecção de
Toxoplasma gondii em macrófagos murinos ativados

João Cláudio Damasceno de Sá

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Drº Renato Augusto DaMatta

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Campos dos Goytacazes, RJ
Agosto 2013**

Ação da fosfatidilserina no mecanismo evasivo de
Toxoplasma gondii a macrófagos ativados

João Cláudio Damasceno de Sá

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Examinada em 29 de agosto de 2013 por:

Prof° Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo – ICBIM - UFU

Profª Dra. Lilian Maria Garcia Bahia Oliveira - LBR - UENF

Prof° Dr. Gustavo Lazzarro Rezende – LQFPP - UENF

Prof° Dr. Renato Augusto DaMatta – LBCT – UENF
Orientador

Campos dos Goytacazes, RJ

Agosto de 2013

**A toda minha família, de modo especial aos meus pais Renato e Heloisa Sá
fundamento do que sou a e aos meus filhos Nina e João e a minha esposa
Vanessa, razão da minha vida.
Dedico.**

A vida é um dom gratuito, um presente que não se conquista. E diante de algo tão transcendente a única atitude que podemos ter é gratidão, por tudo e por todos que colaboraram para enriquecer este dom.

Agradecimentos

À Santíssima Trindade pela vida, por ser o princípio de todas as coisas e meu sustento em todos os momentos.

“Magnificat anima mea Dominum, et exsultavit spiritus meus in Deo salvatore meo...”
Sancti Evangelii Secundum Lucam 1:46-47.

A Renato DaMatta por ser mais que um orientador, mas um amigo que acreditou no meu potencial e sempre me incentivou, por ser um exemplo na ciência e no trato com as pessoas sempre respeitando-as e mostrando que um verdadeiro mestre sempre tem algo a ensinar e que nesse processo também se aprende com o outro. Obrigado pela dedicação, paciência, disponibilidade em ensinar e convivência agradável ao longo desses anos.

A Fernanda de Souza por ser nesses anos o meu braço direito e por que não o esquerdo também, por oferecer ajuda sem ao menos eu pedir, por ser não somente um auxílio simplesmente técnico, mas por trocarmos experiência ao discutir os meus e os seus resultados. Você é uma aluna brilhante. Obrigado por tudo, por estar presente e sempre apta a uma conversa saudável e a um lanchinho não tão saudável assim.

A Juliana Azevedo por ser sempre solícita e pronta a ajudar no laboratório; a frase que sempre lembro de você é “a gente faz esse experimento junto” mesmo quando esse experimento era praticamente só meu. Você foi no laboratório a primeira colega que virou amiga e com quem eu gostaria de conviver não somente nessa fase de estudos mas para sempre. Obrigado por tudo e por estar sempre presente para o que der e vier.

A Carolina Torturella Rath, a minha primeira aluna oficial, com você aprendi como pode ser desgastante e ao mesmo tempo gratificante a tarefa de orientar, e a dar um imenso valor tanto a quem pesquisa diretamente quanto quem orienta, obrigado por permitir esse aprendizado pela ajuda em meus experimentos e pela convivência agradável no laboratório.

A Luciana da Silva pela amizade e disposição para ajudar, por estar presente em todos os momentos, bons e ruins sempre, com uma solução ou ao menos uma sugestão sempre apoiando as minhas reivindicações e por nossos papos que poderiam ser mais comuns no braseirinho.

A Gabriel Rabello por ser exemplo de dedicação a vida acadêmica e de laboratório, por ser um amigo prestativo e ético além de companheiro de conversas descontraídas e bem humoradas no laboratório e infectório.

A Barbarella Macchi por ter passado por nossas vidas e ter sido tão marcante pela sua capacidade intelectual, simpatia e alegria; pena estarmos tão longe de você, o que priva a nossa convivência.

A Laura Mota e Juliana Padrão pela receptividade no laboratório e por terem me inserido em todas as rotinas e me ensinado o básico da cultura de células sempre prontas a ajudar.

A Tiago dos Santos pela ajuda na citometria, sem seu auxílio tudo seria muito difícil, obrigado pela disposição em ajudar, mesmo que os experimentos fossem realizados a noite.

A Sérgio Henrique Seabra, pelas discussões dos resultados e por sempre incentivar a pesquisa com seu otimismo

A todos os companheiros do LBCT Thiago Torres, João Roberto Neto, Farlen Miranda, Letícia Rocha e tantos outros sempre presentes e prontos a ajudar.

Aos técnicos do LBCT, de modo especial a Giovana Moraes, que de certa forma foi a primeira responsável pela minha entrada no laboratório; a Juliana Azevedo (técnica LBR) pela boa vontade e empenho no citômetro. A todos vocês, meu muito obrigado.

A professora Kátia Valevski por ser sempre tão solícita e por ter aceitado revisar esta tese.

A família Damasceno de Sá, particularmente, aos meus pais Renato Sá, Heloisa H. Damasceno de Sá e a minha irmã Úrsula Damasceno de Sá por todo apoio que sempre deram aos meus estudos mostrando que a educação, independente de suas deficiências, é o melhor caminho e que depende essencialmente da dedicação pessoal.

A família que eu formei. Obrigado a minha esposa Vanessa Peres Vasconcellos de Sá por me amar e me querer bem incentivando os meus estudos seja em qualquer área, respeitando a minha falta de tempo e ausência mesmo quando “presente” em casa “grudado” ao computador. Você é um exemplo de mulher e mãe, te amo.

Aos meus filhos Nina Perez Vasconcellos de Sá e João Perez Vasconcellos de Sá, agradeço simplesmente por vocês fazerem a minha vida ter sentido e por serem um grande presente de Deus e peço desculpas pela falta de tempo, por não aproveitar da melhor maneira essa linda fase da vida de vocês, pela eterna falta de tempo que tantas vezes me fez pensar se tudo isso vale a pena. Um dia, espero que vocês entendam toda loucura que é tentar ser um cientista. E espero antes de tudo ser feliz nessa árdua, mas gratificante tarefa que é educar os filhos. Que Deus os abençoe sempre e porventura outros que a providência me enviar. Amo vocês.

SUMÁRIO

Pág.

Lista de abreviaturas.....	I
Lista de figuras e tabelas.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
1.0 – Introdução.....	01
1.1- Diversidade de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> clássicas e recombinantes com ênfase em virulência.....	04
1.2 - Macrófagos como células microbidas.....	06
1.3 - Penetração ativa de <i>Toxoplasma gondii</i>	08
1.4 - Fusão com lisossomos.....	10
1.5 - Inibição na produção de óxido nítrico.....	11
1.6 - Papel da fosfatidilserina.....	13
1.7 - IRGs e infectividade do <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2.0 – Objetivo geral.....	22
2.1. Objetivos específicos.....	22
3.0 – Materiais e métodos	
3.1 - Macrófagos e ativação.....	23
3.2 - Parasitos e animais.....	23
3.3 - Infecção <i>in vitro</i> e quantificação da infecção e persistência parasitária.....	23
3.4 - Análise da produção de óxido nítrico.....	24
3.5 - Avaliação da viabilidade de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	24
3.6 – Imunofluorescência.....	25
3.7 - Exposição de fosfatidilserina.....	25
3.8 - Análise dos dados.....	26
4.0 – Resultados	
4.1 - Análise morfológica de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> e viabilidade das cepas RH, ME-49, P-Br e VEG em macrófagos ativados.....	27
4.2 - Avaliação da entrada, persistência, desenvolvimento e viabilidade de	

taquizoítos.....	29
4.3 - Produção de nitrito e expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados e infectados com taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> das cepas RH, ME-49, P-Br e VEG.....	32
4.4 - Localização de óxido nítrico sintase induzida e taquizoítos em macrófagos ativados infectados.....	34
4.5 - Localização de SMAD 2 fosforilada (PS2) e taquizoítos em macrófagos ativados e infectados.....	36
4.6 - Avaliação da exposição de fosfatidilserina e produção de citocinas pelas cepas RH, ME-49, P-Br e VEG através de citometria de fluxo.....	38
4.7 - Localização de marcador de autofagia LC3 em macrófagos ativados e infectados.....	40
5.0 – Discussão.....	42
6.0 – Conclusões.....	51
7.0 – Referências bibliográficas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATG 5	Proteína autofágica 5
ERK2	<i>Extracelular signal-regulated kinase 2</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HLA	Antígenos de Histocompatibilidade Humano
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRG	<i>Immunity related guanosine triphosphatases</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
PS	Fosfatidilserina
NO	Óxido nítrico
ROP quinase	<i>Polymorphic rhoptry protein kinase</i>
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta 1
VP	Vacúolo parasitóforo

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Pág.

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	02
Figura 2: Imagens de campo claro de macrófagos ativados e infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> de diferentes cepas corados com Giemsa.....	28
Figura 3 Taxa de sobrevivência de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (cepa RH) recuperado de macrófagos peritoneais de camundongos infectados após 2, 24, 48, 72 e 96 h de interação.....	31
Figura 4: Imunofluorescência da expressão de iNOS (verde) e <i>Toxoplasma gondii</i> (vermelho) em macrófagos infectados	35
Figura 5: Imunofluorescência de SMAD2 fosforilada (verde) e <i>Toxoplasma gondii</i> (vermelho) em macrófagos infectados	37
Figura 6: Exposição de fosfatidilserina (PS) por taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> de diferentes cepas.....	39
Figura 7: Imunofluorescência de LC3 (verde), taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (vermelho), e núcleo (azul) em macrófagos infectados.....	41
Figura 8: Hipótese da infecção causada por <i>Toxoplasma gondii</i> cepa RH em macrófagos murinos ativados.....	52
Figura 9: Hipótese da infecção causada por <i>Toxoplasma gondii</i> cepas ME-49 e PB-r em macrófagos murinos ativados.....	53
Figura 10: Hipótese da infecção causada por <i>Toxoplasma gondii</i> cepa VEG em macrófagos murinos ativados.....	54
Tabela 1: Entrada e persistência de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> cepas RH, ME-49, P-Br e VEG em macrófagos ativados.....	30
Tabela 2: Produção de nitrito de macrófagos peritoneais de camundongo ativados e infectados com taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> das cepas RH, ME-49, P-Br e VEG.....	33

Resumo

Toxoplasma gondii é considerado um parasito generalista com distribuição mundial, sendo extremamente bem sucedido por escapar do sistema imunológico do hospedeiro, podendo causar doenças em humanos. Um dos mecanismos de evasão de *T. gondii* contra macrófagos murinos ativados é baseado na exposição de fosfatidilserina (PS), que induz a secreção do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β), resultando na degradação da óxido nítrico (NO) sintase induzida (iNOS) e diminuição da produção de NO, potente agente microbicida. As cepas de *T. gondii* são classificadas em linhagens clonais clássicas, genótipos tipo I, II ou III, com diferenças em virulência para camundongos. Ademais, cepas recombinantes apresentam graus de virulência distintos. A correlação entre a exposição de PS e a capacidade de evasão do sistema microbicida baseado na produção de NO e autofagia foi investigada por meio de taquizoítos de quatro diferentes cepas de *T. gondii* (RH, tipo I; ME-49, tipo II; VEG, tipo III; e P-Br, recombinante) com macrófagos peritoneais murinos ativados. A produção de NO foi efetivamente inibida pela cepa RH que persistiu em macrófagos negativos para iNOS. VEG inibiu NO em níveis menores que RH e os macrófagos infectados apresentaram alguma marcação para iNOS. Macrófagos infectados com as cepas ME-49 e P-Br foram vistos como negativos para iNOS após 2 h de infecção e produziram níveis intermediários de NO, após 24h e níveis similares aos de macrófagos não infectados após 48h. Não foram detectados parasitos no interior dos macrófagos nesse período. Macrófagos apresentaram marcação no núcleo para smad2 fosforilada após 2 h de infecção com todas as cepas, confirmando a sinalização do TGF- β na reversão da expressão da iNOS. Entretanto, somente RH manteve o sinal durante todo o período avaliado, enquanto VEG manteve o sinal em baixa intensidade. Taquizoítos de ME-49 expõem PS em maior proporção que as outras cepas avaliadas, sendo RH a que menos expõe PS. Vesículas autofágicas foram observadas próximas aos taquizoítos de ME-49, VEG e P-Br e em menor proporção ao redor de taquizoítos de RH. Todas as cepas expuseram PS, o que é importante nos momentos iniciais da infecção para entrada e inibição de NO através de sinal por TGF- β , porém outras estratégias são utilizadas pelas cepas virulentas para persistir em macrófagos. Cepas menos virulentas aparentemente são destruídas por outros sistemas microbicidas como a participação de componentes autofágicos.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, fosfatidilserina, óxido nítrico, autofagia

Abstract

Toxoplasma gondii is considered a generalist parasite with a worldwide distribution, being extremely successful to escape the host immune system and can cause disease in humans. One of the evasion mechanisms of *T. gondii* against activated murine macrophages is based on the exposure of phosphatidylserine (PS), which induces the secretion of transforming growth factor beta 1 (TGF- β), resulting in the degradation of nitric oxide (NO) synthase (iNOS) and decreased production NO, a potent microbicidal agent. The strains of *T. gondii* are classified in classic clonal lineages genotypes type I, II or III, with differences in virulence for mice. In addition, recombinant strains exhibit different degrees virulence. The correlation between PS exposure and evasion capacity from the microbicide system based on NO production and autophagy was investigated by means of tachyzoites from four different strains of *T. gondii* (RH, type I, ME-49, Type II; VEG, type III, and P-Br, recombinant) with murine peritoneal macrophages activated. The production of NO was effectively inhibited by the RH strain that persisted in macrophages negative for iNOS. VEG inhibited NO at levels slightly lower than RH and showed some labeling to iNOS. Macrophages infected with strains ME-49 and P-Br were show to be negative for iNOS 2 hours after infection and produced intermediate levels of NO, after 24 hours and similar levels to those from non-infected macrophages, after 48 hours. No parasites were detected within macrophages during this period. Macrophages showed nuclei labeling for phosphorylated Smad2 after 2 hours of infection with all strains, confirming the TGF- β signaling in the reversion of iNOS expression. However, only RH the kept signal throughout the study period while, VEG signal kept low intensity. Tachyzoites of ME-49 of exposed PS in a higher extent than other tested strains, being RH the one that least exposed. Autophagic vesicles were observed near the tachyzoites of ME-49 and PB-r, VEG and to a lesser extent around tachyzoites of RH. All strains exposed PS what is important in the early stages of infection for input and inhibition of NO by signal of TGF- β , but other strategies are used by virulent strains to persist in macrophages. Less virulent strains are apparently destroyed by other systems such as microbicides participation of autophagy.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, phosphatidylserine, nitric oxide, autophagy.

1. Introdução

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar, como hospedeiro intermediário, praticamente qualquer animal endotérmico (Dubey e Frenkel., 1998; Saeij et al., 2005). As formas do parasito durante o seu ciclo de vida são: esporozóitos contidos em oocistos esporulados, taquizoítos, forma de multiplicação rápida encontrada nos tecidos durante o ciclo lítico; bradizoítos, forma de multiplicação lenta encontrado em cistos teciduais (Toxoplasmosis, 2005). *Toxoplasma gondii* possui complexo ciclo de vida. Após a ingestão de carne contaminada por membros da família Felidae, alguns dos bradizoítos multiplicam-se no interior das células epiteliais do intestino delgado (enterócitos) desses animais. Depois de numerosos ciclos de reprodução assexuada nessas células estes bradizoítos iniciam o ciclo sexual que termina com a geração de oocistos que são liberados nas fezes. Felinos podem também se infectar com esporozoítos ou mesmo taquizoítos e o mesmo processo acontece com velocidades distintas (Toxoplasmosis, 2005).

A reprodução sexual ocorre nos enterócitos dos membros da família Felidae, e o intercâmbio genético entre diferentes cepas só pode ocorrer nos casos em que um felino é infectado simultaneamente com cepas geneticamente distintas. Com a reprodução sexuada, após encontro dos gametas masculino e feminino, milhões de oocistos não esporulados são excretados nas fezes dos gatos. No ambiente ocorre a esporulação desses oocistos que pode demorar de 1 a 5 dias sob condições ideais ou até várias semanas (Saeij et al., 2005; Howard et al., 2011). Oocistos esporulados passam a ter dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos haplóides. Felinos costumam liberar oocistos durante uma a duas semanas; estes são altamente resistentes às condições ambientais, permanecendo até 18 meses em água e solo úmido. Cistos teciduais podem permanecer infecciosos por semanas em carne mal cozida (Toxoplasmosis, 2005) (Figura 1).

Como resultado da meiose, muitos dos oocistos conterão esporozoítos de genótipos diferentes, e assim, um número enorme de novos organismos geneticamente distintos são gerados a partir de um único gato infectado (Saeij et al., 2005; Howard et al., 2011). Animais podem ingerir esses oocistos, e posteriormente, selecionar o mais bem sucedido destes genótipos. Uma evidência de que essa seleção ocorre é que atualmente a maioria das cepas de *T. gondii* na Europa e

América do Norte parece ser de apenas três linhagens clonais distintas (Howe e Sibley, 1995; Saeij et al., 2005; Adomako-Ankomah et al., 2012).

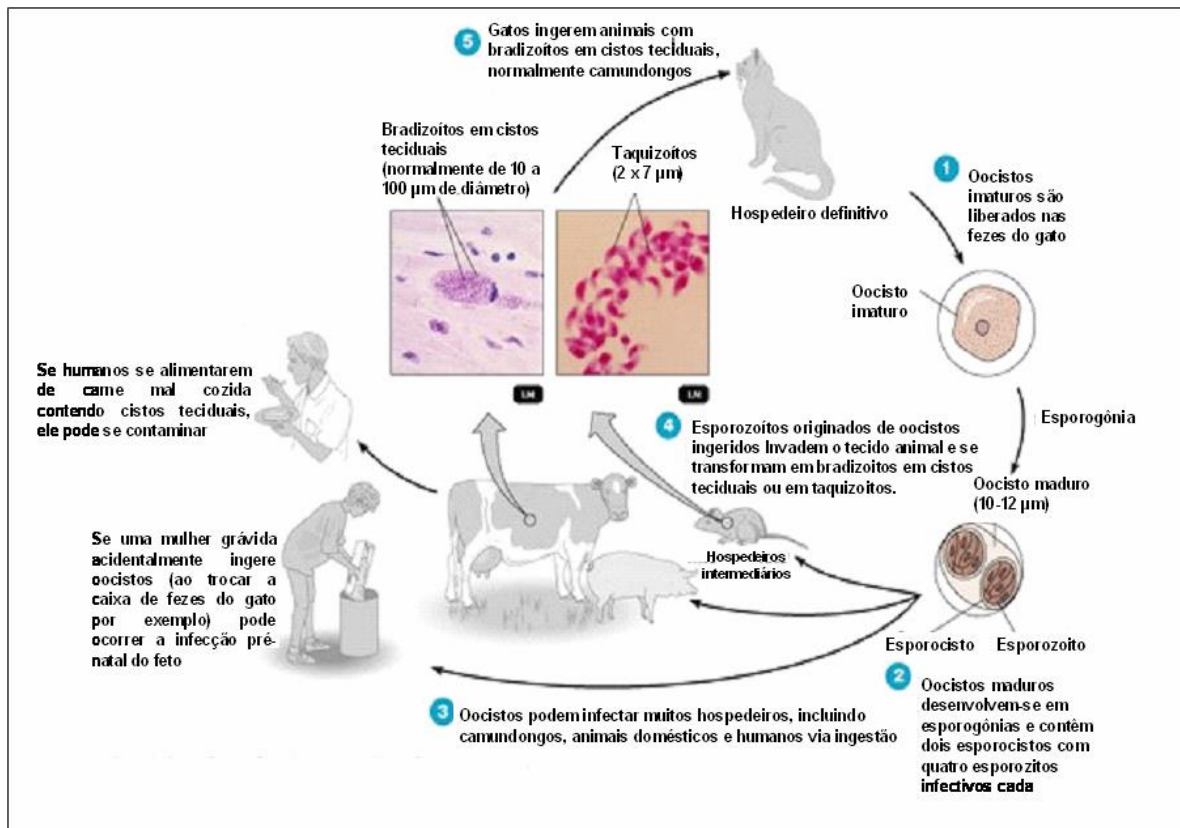


Figura 1: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. (1) Oocistos imaturos são liberados no ambiente pelo hospedeiro definitivo (felinos). (2) No ambiente oocistos maduros desenvolvem-se gerando quatro esporozoítos infectivos. (3) Oocistos infectivos podem infectar animais de sangue quente seja pela ingestão acidental ou o consumo de carne contaminada. (4) Esporozoítos invadem o tecido animal e se transformam em bradizoítos e em indivíduos imunocomprometidos a doença pode se manifestar. (5) No hospedeiro definitivo após se alimentarem de animais contaminados com cistos teciduais, ou oocistos contaminantes do ambiente, pode ocorrer a reprodução sexuada e subsequente liberação de oocistos no meio ambiente reiniciando o ciclo. Baseado e adaptado de Pearson Education, Inc. 2004.

A ingestão de alimentos e água contaminada com oocistos e a passagem congênita do parasito de mães contaminadas para fetos são as principais formas de se adquirir a doença que atinge em torno de 33% da população mundial. Questões socioeconômicas da população, como saneamento básico e baixo nível de escolaridade, potencializam o contágio pelo parasito (Bahia-Oliveira et al., 2003; Datolli et al., 2011). Surtos de toxoplasmose já foram relatados devido a contaminação de reservatório e tratamento inadequado da água disponibilizada a população (Moura et al., 2006). Além disso, a ingestão de cistos teciduais através da

ingestão de carne mal cozida pode levar a infecção em hospedeiros intermediários, incluindo seres humanos (Behnke et al., 2011; Wang et al., 2012).

Em humanos as infecções são comuns e comumente assintomáticas em indivíduos imunocompetentes, nos quais normalmente o sistema imune consegue controlar o parasito induzindo os taquizoítos a se diferenciarem em bradizoítos que persistem no hospedeiro dentro de cistos teciduais, aparentemente refratários à forte resposta imune induzida contra os taquizoítos (Julien et al., 2004). Em indivíduos imunocomprometidos (portadores de HIV, imunodeprimidos farmacologicamente), os bradizoítos se convertem em taquizoítos causando doença, afetando principalmente o sistema nervoso central, músculos esqueléticos e órgãos viscerais (Hill et al., 2005). Em gestantes, *T. gondii* pode se proliferar na placenta, passar para os tecidos fetais e causar graves problemas ao feto, os quais costumam ser mais graves na primeira metade da gestação (Dubey et al., 2002). As patologias vão desde microcefalia, crescimento intra-uterino retardado, hidrocefalia e até mesmo morte (Dubey et al., 2002).

Em outros animais endotérmicos a infecção pode ser transmitida quando um animal predador ou necrófago ingere partes de outro animal contaminado com bradizoítos, persistentes em cistos teciduais, que podem reiniciar o processo infectivo. Teoricamente, *T. gondii*, ao contrário dos outros Apicomplexa, pode ser perpetuado assexuadamente desta maneira (Saeij et al., 2005; Howard et al., 2011).

Outra característica da toxoplasmose é que o parasito pode alterar o comportamento do hospedeiro intermediário para facilitar a transmissão para o hospedeiro definitivo (felinos) (Berdoy et al., 2000). A presença do parasito em regiões do cérebro de roedores altera o seu comportamento o que favorece a disseminação do protozoário para o hospedeiro definitivo, alterando, por exemplo, o comportamento natural dos roedores de aversão ao odor de felinos, e posterior fuga, tornando-os letárgicos (Vyas et al., 2007; Berdoy et al., 2000). Camundongos infectados têm a sua capacidade de exploração do ambiente prejudicada, tendendo a ficar parados em áreas periféricas do campo de estudo, o que no ambiente natural facilitaria a predação pelo hospedeiro definitivo (Berdoy et al., 2000). Esse comportamento é selecionado positivamente, pois gera variabilidade genética já que

facilita a predação pelo hospedeiro definitivo no qual ocorre a fase sexuada do ciclo de vida (Berdoy et al., 2000).

A alteração do comportamento também foi observada em humanos, onde evidências relacionam a presença de cistos cerebrais como fator de risco para o desenvolvimento de quadros de esquizofrenia e depressão (Fekadu et al., 2010) relatando inclusive a alta prevalência de *T. gondii* em pacientes esquizofrênicos quando comparados com pacientes saudáveis (Fekadu et al., 2010).

O estudo sobre *T. gondii* é importante não somente devido ao problema de saúde pública, mas também por ser um modelo especialmente fácil para se estudar parasitismos intracelulares dos apicomplexas que também incluem outros patógenos importantes como: *Eimeria*, *Neospora*, *Babesia*, *Theileria* e *Cryptosporidium* (Saeij et al., 2005; Kuo, et al., 2008). Ao contrário da maioria destes organismos, *T. gondii* pode ser cultivado e facilmente transfectado tanto transitoriamente quanto de forma estável, cruzado, e estudado geneticamente *in vitro* e em modelos animais diversos (Saeij et al., 2005).

1.1. Diversidade de cepas de *Toxoplasma gondii*

Estudos moleculares demonstraram que *T. gondii* se divide basicamente em três tipos de linhagens geneticamente clonais: I, II e III (Howe e Sibley, 1995; Ajzenberg et al., 2004). As diferenças genéticas entre essas linhagens variam de 0,5 a 5% sendo geralmente inferiores a 2% (Grigg et al., 2001; Adomako-Ankomah et al., 2012). Apesar da semelhança genética, as linhagens diferem de forma marcante em sua virulência em camundongos e humanos sendo as cepas do tipo I extremamente virulentas com dose letal de 100% para um único parasito viável ($LD_{100} = 1$), enquanto as tipo II e III possuem virulência bem mais branda com dose letal de 50% para centenas a milhares de parasitos ($LD_{50} > 10^2 - 10^6$) (Sibley e Boothroyd, 1992). Parte da explicação para a restrita estrutura populacional em *T. gondii* se deve à capacidade do parasito ser transmitido a hospedeiros intermediários, através de carne e água contaminadas, sem passar por eventos de recombinação que só ocorrem no hospedeiro definitivo (Su et al., 2003).

Muitos gametas femininos (macrogametas) dos parasitos permanecem não fertilizados no intestino dos felinos, mas formam oocistos por partenogênese, facilitando a geração de populações clonais (Ferguson, 2002). Infecção de felinos com diferentes cepas aparentemente é um evento raro na natureza o que acaba

sendo uma barreira temporal para que ocorra recombinação gênica. Essa recombinação, mesmo sendo um evento ocasional, gera diversidade genética em *T. gondii* (Ajzenberg et al; 2004).

Cepas isoladas do Brasil são biologicamente e geneticamente diferentes das isoladas na América do Norte e Europa (Dubey et al., 2010). Isolados de *T. gondii* de galinhas que não manifestavam a doença eram mais patogênicos a camundongos do que os isolados da América do Norte e Europa, independente do seu genótipo o que sugere diversos genótipos circulantes e permite assim uma gama de cepas com diferentes níveis de virulência (Dubey et al., 2008). Na América do Sul parece ocorrer grande variabilidade genética que não parece ser tão comum em outras regiões do planeta (Dubey et al., 2008).

A maioria dos tipos clonais isolados no Brasil são bem diversificados com prevalência de tipos recombinantes (Dubey e Su, 2009). Somente em Fernando de Noronha, arquipélago a 350 km da costa do Brasil, foram encontrados 4 novos genótipos (Dubey e Su, 2009). Isso estaria relacionado à forma de transmissão que no Brasil se dá mais por água e solo contaminados com oocistos (Dubey e Su, 2009). Recentemente, foi proposto que a variabilidade genética de *T. gondii* é bem vasta e teria surgido através da mistura genética de até oito fundadores que culminou na atual diversidade mundial dividida em seis clados (Su et al., 2012).

1.2. Macrófagos como células microbicidas

Os macrófagos fazem parte do sistema imunológico e, em adultos, são derivados de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, as quais originam monócitos que migram para a circulação sanguínea e depois para os tecidos se diferenciando em macrófagos (van Furth, 1975). Esse conjunto de células faz parte do sistema mononuclear fagocítico (van Furth, 1975) e atuam em vários tecidos onde desempenham importante papel em processos coordenados, como o desenvolvimento das defesas do hospedeiro pela secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos atuam unindo a imunidade inata com a adaptativa através da apresentação de antígenos (expressão em macrófagos de MHC classe II) e estimulação de receptores do tipo CD80 e CD86 de linfócitos T. O papel dos macrófagos no processo de resposta imune e inflamação é um campo de estudos intensivos (Pinhal-Enfield et al., 2003; Ramanathan et al., 2007).

Os macrófagos apresentam grande plasticidade. Quando não estimulados, essas células expressam baixos níveis de citocinas e fatores de crescimento.

Entretanto estímulos do ambiente ao seu redor como patógenos, citocinas, hipóxia e isquemia geram respostas diferenciadas (Pinhal-Enfield et al., 2003; Ramanathan et al., 2007).

Em resposta a estímulos do ambiente os macrófagos são classificados como polarizados no sentido inflamatório ou anti-inflamatório, embora esses estados não sejam muito claros e possam ser modulados devido aos diversos agentes ativadores. Atualmente eles são tipicamente descritos como macrófagos “classicamente” ativados (M1) ou alternativamente ativados (M2) quando atuam nos processos de cicatrização de tecidos (Martinez et al., 2009). Entretanto, dependendo do tempo e do tipo de estímulo de ativação, os macrófagos podem variar em seus estados e intensidade de ativação (Porcheray et al., 2005; Classen et al., 2009; Martinez et al., 2009; Daley et al., 2010).

Macrófagos do tipo M1 são induzidos durante injúrias e infecções que promovem processos inflamatórios e resposta imune do tipo Th1, acarretando na destruição de microrganismos e células tumorais. Macrófagos M2 podem apresentar efeitos imunossupressores com a produção de citocinas anti-inflamatórias, aumentando a fagocitose e eliminação de restos celulares, e a secreção de fatores de crescimento que estimulam o remodelamento e a reparação tecidual, além de estimular a resposta imune do tipo Th2. Entretanto esses são aspectos extremos do processo de atuação dos macrófagos que apresentam, dependendo do estímulo, nuances e gradações entre as ativações dos tipos M1 e M2 (Pinhal-Enfield e Leibovich, 2011).

Em geral, quando o tecido está infectado por algum tipo de microrganismo, os monócitos recém liberados da medula óssea para a corrente sanguínea são recrutados para os tecidos por quimiocinas secretadas pelas células efectoras do tipo Th1, as quais estão respondendo ao antígeno no tecido. Esse ambiente torna os macrófagos ativados e aptos a eliminar patógenos. A ativação dessas células se dá pela liberação de diversos tipos de citocinas como o interferon-gama (IFN- γ), liberado por células efectoras que em conjunto com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), as tornam aptas ao processo de defesa por ativação clássica (Adams e Hamilton, 1992).

Os macrófagos são células fagocíticas profissionais e produzem diversas substâncias que atuam na destruição do microrganismo fagocitado, além de recrutar outras células de defesa que amplificam essa resposta. A ativação clássica induz a

expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que converte arginina em citrulina e NO (Vincendeau et al., 2003). Óxido nítrico (NO) é um potente agente microbicida e após ativação dos macrófagos é produzido em grandes quantidades (Stuehr e Marletta, 1987). A produção de NO, espécies reativas de oxigênio, enzimas lisossomais e citocinas acarreta na destruição e eliminação de microrganismos (Stuehr e Marletta, 1987; Aline et al., 2002).

Reconhecidos por um complexo sistema de receptores de membrana que inclui receptores para porção Fc de imunoglobulinas (Ig), receptores para proteínas do complemento e receptores para carboidratos específicos (Adams, 1994), os patógenos são fagocitados através da atuação do citoesqueleto celular e de organelas celulares, como o complexo de Golgi que libera vesículas que migram ao ponto de reconhecimento da partícula e se fusionam formando o fagolisossomo, que irá então se fundir a lisossomos contendo enzimas digestivas acarretando na destruição do organismo ou partícula invasora (Kaufmann et al; 2004).

Ao ter a sua membrana plasmática rompida dentro do macrófago, o parasito expõe algum tipo de antígeno que induz a autofagia. Vesículas alongadas de dupla membrana característica de autofagossomo envolvem *T. gondii* e finalmente se fundem a lisossomos, acarretando na destruição total do microorganismo (Ling et al., 2006; Kirkegaard et al., 2004).

1.3. Penetração ativa de *Toxoplasma gondii*

O fato de *T. gondii* infectar tanto células fagocíticas profissionais quanto as não fagocíticas sempre intrigou os pesquisadores (Schwartzman, 1986). A observação em cultura que mesmo parasitos sem mobilidade aparente eram capazes de infectar células e se reproduzir sugeriu que a entrada do parasito poderia não estar relacionada somente a fatores físicos e mecânicos, mas possivelmente a fatores químicos (Norrby e Lycke, 1967).

Um dos experimentos precursores tentando comprovar a participação de fatores químicos no processo de invasão de células hospedeiras utilizou suspensão de lisado de *T. gondii* que era adicionada ao meio de cultura das células, as quais foram posteriormente infectadas por parasitos vivos. A cultura que recebeu esse lisado apresentou cerca de 50% mais células hospedeiras infectadas em relação as que não receberam o tratamento, principalmente nos momentos iniciais da interação

(Norrby e Lycke, 1967). Desse modo ficou comprovado que algum fator contido em *T. gondii* facilitaria o processo de entrada do parasito na célula hospedeira.

Nesse mesmo trabalho os autores sugerem que esse fator, por eles denominado *fator que facilita a penetração do parasito na célula hospedeira*, seria solúvel, pois a utilização do precipitado do lisado de *T. gondii*, após centrifugação, na cultura de células não apresentou diferença significativa, em relação ao não precipitado, na entrada de parasitos na célula. A participação de enzimas lisossomais que era cogitada em trabalhos anteriores foi refutada devido ao fato de o lisado de *T. gondii* ser instável em pHs ácidos (Norrby e Lycke, 1967).

A produção do fator de penetração foi relacionada à invasão da célula hospedeira pelo protozoário e a cinética dessa síntese relacionada à fase de multiplicação, com maior produção desse fator. Este fator tem duração curta quando adicionado ao meio de cultura sugerindo que é sintetizado continuamente pelo parasito e é importante nos processos iniciais de invasão (Norrby, 1970a).

Parasitos que tiveram contato com células hospedeiras são mais hábeis a invadir outras ao contrário daqueles que não tiveram esse contato inicial. A liberação do possível fator responsável pela penetração ativa estaria na origem do processo infectivo (Norrby, 1970a).

Avaliação bioquímica do fator de penetração revelou que a sua fração ativa é uma enzima de caráter ácido com dois componentes com peso molecular entre 70.000 e 150.000 e sua temperatura ótima de atividade é 37°C (Norrby, 1970a). Marcação com anticorpo localizou essa enzima na porção anterior do parasito em uma organela tubular com possível atividade secretória. Essa região do parasito estaria relacionada à produção e secreção dessa enzima e seria a responsável pela penetração ativa na célula hospedeira (Norrby, 1970b).

A utilização do fator de penetração em altas concentrações acarreta no rompimento da membrana da célula hospedeira. A estrutura responsável pela sua liberação seriam as róprias (Lycke et al., 1975)

Outra característica importante da invasão da célula hospedeira é que a formação do vacúolo parasitóforo (VP) impede que o lisossomo da célula hospedeira se funda a esse VP, protegendo o parasito dos conteúdos ácidos dessa organela (Jones e Hirsh, 1972).

A partir dos resultados obtidos por vários pesquisadores e primordialmente os de Jones e Hirsh, em 1972, e de Lycke e colaboradores (1975) acredita-se que a

invasão da célula hospedeira por *T. gondii* se dá por penetração ativa. A membrana plasmática da célula hospedeira seria afetada por fatores mecânicos do parasito e quimicamente por uma enzima possivelmente liberada pela rópria responsável por tornar o VP refratário a fusão com lisossomos, permitindo assim o sucesso da infecção (Lycke et al., 1975).

A combinação de dados morfológicos e funcionais foi decisiva em determinar que o fator de penetração é uma enzima que é estocada e liberada pelas róprias sendo responsável pelo processo de penetração ativa do parasito e não um processo de fagocitose pela célula hospedeira (Schwartzman, 1986). Posteriormente foi observado que somente parasitos vivos liberavam a enzima responsável pela penetração ativa e que algum fator seria responsável pela ligação de *T. gondii* a célula hospedeira nos momentos iniciais do contato com a célula e posterior invasão. Ou seja, além da liberação de enzimas pela rópria, o reconhecimento e aderência do parasito a célula hospedeira era de extrema importância no processo infectivo e que *T. gondii* opsonizados com anticorpos eram fagocitados e, portanto, destruídos pela fusão com lisossomos (Morisaki et al., 1995).

1.4. Fusão com lisossomos

Análises por microscopia eletrônica de transmissão indicaram que o VP contendo *T. gondii* é distinto do fagossomo (Jones e Hirsch, 1972). Foi observado que vacúolos contendo parasitos viáveis não se fundiam aos lisossomos (mesmo cercados de lisossomos, estes não se fundiam) ao passo que VP com parasitos mortos ou opsonizados com anticorpos se fundiam rapidamente aos lisossomos, sendo o parasito destruído (Jones e Hirsch, 1972).

A forma como o parasito entra na célula hospedeira determina o que irá ocorrer posteriormente na célula. Os parasitos ligados a anticorpos ou mortos são fagocitados pela célula hospedeira e posteriormente lisossomos se fundem ao vacúolo formando um fagolisossomo. Parasitos vivos, por sua vez, não são fagocitados, mas entram ativamente formando o VP refratário a fusão com o lisossomo (Jones e Hirsch, 1972; Endo et al., 1981; Boyle e Radke, 2009).

Foi observado que na ausência de fusão ao lisossomo o parasito não necessita permanecer vivo no VP, mas somente no momento da invasão, demonstrando que o fator responsável por esse fenômeno não estava relacionado a algum fator de secreção solúvel liberado constantemente pelo protozoário, mas sim

à construção de um nicho protegido que, após a invasão e a modificação da membrana do VP, impede a fusão com lisossomos e posterior degradação enzimática (Joiner et al., 1990).

A ausência de fusão do lisossomo ao VP estaria relacionada à secreção de diversas proteínas de *T. gondii* por organelas especializadas como róptrias e micronemas, diretamente no interior do VP em formação, as quais se ligariam a membrana desse vacúolo dando-lhe identidade própria e permitindo a evasão do sistema de fusão da célula hospedeira (Beckers et al., 1994).

Um dos mecanismos propostos para a não fusão do VP com lisossomos também estaria relacionado à capacidade do parasito em alterar o tráfego de organelas da célula hospedeira através da secreção de proteínas como a ROP2 que ficam expostas na membrana e atua na associação entre o VP e mitocôndrias (Beckers et al., 1994). Outras proteínas relacionadas às junções e que se ligam ao núcleo da célula hospedeira modificam a sua fisiologia em favor de *T. gondii* (Beckers et al., 1994, Sinai e Joiner., 2001; Boothroyd e Dubremetz, 2008).

O recrutamento de diversas organelas das células hospedeiras como retículo endoplasmático e mitocôndrias é a maior evidência das alterações e inserção no sistema genético da célula invadida, o que não é observado em parasitos que foram fagocitados e que são rapidamente destruídos (Sinai et al., 1997; Boyle e Radke, 2009).

1.5. Inibição na produção de óxido nítrico

Óxido nítrico (NO) é um importante agente microbicida em macrófagos e outras células hospedeiras ativadas por interferon (Habib e Ali, 2011). Macrófagos são capazes de sintetizar o NO através da iNOS sem dependência de cálcio (Adams et al., 1990; Habib e Ali, 2011). A iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo (Stuehr et al., 1991), caracterizando seu envolvimento em diversos processos patológicos consequentemente restringindo a replicação intracelular de parasitos como *T. gondii* (Adams et al., 1990; Flora Filho e Zilberstein, 2000; Seabra et al., 2002; Lüder et al., 2003, Habib e Ali, 2011). Além da função antiparasitária, a iNOS possui importante papel na regulação do sistema imune através da inibição na produção de citocinas e proliferação de linfócitos T (Candolfi et al., 1994; Hayashi et al., 1996).

Aparentemente o NO só é útil à célula hospedeira nos momentos iniciais da infecção por *T. gondii*, pois assim que a fase latente da infecção se estabelece a iNOS não é mais requerida para a resistência do hospedeiro contra a reativação parasitária (Lüder et al., 2003). Todavia a diminuição na produção de NO é necessária para a replicação do parasito em macrófagos ativados (Seabra et al., 2002).

A modulação na produção de NO pelos parasitos é de grande importância para o processo infectivo, pois a neutralização da iNOS ou o bloqueio do gene para iNOS em camundongos torna-os mais susceptíveis a toxoplasmose levando ao aumento da mortalidade (Hayashi et al., 1996; Khan et al., 1997). A inibição, deleção ou neutralização do gene da iNOS em camundongos leva a aumento na proliferação do parasito, e a inibição na produção de NO acarreta aumento da toxoplasmose cerebral (Scharton-Kersten et al., 1997; Khan et al., 1997; Schlüter et al., 1999).

Linhagens de *T. gondii* de alta virulência são capazes de inibir a produção de NO (Seabra et al., 2002). Porém isso depende da taxa de infecção, pois quando se aumenta a taxa de infecção de cepa não virulenta (exemplo: ME-49) por célula hospedeira a produção de NO é parcialmente inibida, e independe do tempo de ativação dos macrófagos sendo observada produção de NO após 12 h de ativação (Lüder et al., 2003). Isso sugere que a taxa de infecção é um fator importante na estratégia de evasão (Lüder et al., 2003).

A magnitude da ativação também é um fator importante no processo de evasão, pois em macrófagos altamente ativados a inibição da produção de NO não foi suficiente para permitir a propagação do parasito (Lüder et al., 2003). O aumento na produção de NO pela célula hospedeira é limitado, mesmo aumentando a concentração de fatores de ativação. Altos níveis de NO são tóxicos para o organismo hospedeiro acarretando em destruição de células do intestino e fígado. Isso explica em parte a limitação no seu aumento (Lüder et al., 2003). De certo modo a diminuição na produção de NO pode ser vantajosa para o hospedeiro e conseqüentemente para o parasito (Lüder et al., 2003), evitando assim problemas para o organismo como um todo. A limitação no aumento da produção de NO pela célula hospedeira, causada pelo parasito, controla a sua replicação, porém não acarreta sua destruição total (Seabra et al., 2002; Seabra et al., 2004b). Isso leva a crer que esse mecanismo de evasão é também um mecanismo de equilíbrio entre o parasito e hospedeiro, evitando assim a sua replicação demasiada que acarretaria

na morte do hospedeiro que não seria vantajoso para nenhum dos envolvidos no processo parasitário (Lüder et al., 2003).

O mecanismo pelo qual o parasito consegue diminuir a produção de NO pela célula hospedeira se dá através da indução de TGF- β onde inicialmente ocorre redução da expressão de iNOS via proteossomo (Padrão et al., 2009; Cabral et al., 2011) e desaparecimento de NF-kB do núcleo (Seabra et al., 2004a). Entretanto o mecanismo molecular da subversão da sinalização de ativação envolvido não está bem estabelecido.

1.6. Papel da fosfatidilserina

Os mecanismos de evasão de protozoários são bastante diversificados. Um exemplo é a capacidade de interferência no controle da morte celular das células hospedeiras, como no caso da *Theileria parva* que infecta linfócitos T de bovinos inibindo a apoptose destas células, aumentando a sobrevivência do parasito (Dobbelaere et al., 2000). Outra estratégia parasitária é a imitação do efeito anti-inflamatório causado por células apoptóticas (Barcinski et al., 2003), como é o caso da *Leishmania*, para a qual tem se demonstrado que a exposição de fosfatidilserina (PS) induz efeitos anti-inflamatórios em macrófagos via secreção do TGF- β . A exposição de PS varia de acordo com a fase do ciclo de vida do parasito (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006; Wanderley et al., 2009; Wanderley e Barcinski, 2010). Em promastigotas de *L. amazonensis*, uma subpopulação mais madura expõe PS e morre por apoptose e em amastigotas a população total do parasito expõe PS em sua superfície, evento que não necessariamente é seguido por morte celular (Wanderley e Barcinski, 2010).

A PS é um fosfolípido de membrana, mantido na face interna da membrana plasmática, que quando translocada para a face externa da membrana plasmática sinaliza o estado apoptótico de células (Fadok et al., 1998). Esta translocação é conhecida como um dos marcadores mais importantes da apoptose, sendo responsável pela resposta anti-inflamatória induzida em macrófagos após o contato ou fagocitose de células ou corpos apoptóticos (Fadok et al., 1998; 2000).

A infecção por *T. gondii* diminui a produção do NO (DaMatta et al., 2000; Seabra et al., 2002; 2004a; 2004b; Guillermo e DaMatta, 2004) através da redução da expressão da iNOS nos macrófagos infectados, tanto de galo (Guillermo e DaMatta, 2004) como de camundongo (Seabra et al., 2002; 2004b). Demonstrou-se

que o TGF- β é induzido em macrófagos infectados, resultando no desaparecimento da iNOS e consequente inibição da produção de NO e que somente 50% da população expõe PS (Seabra et al., 2004a).

A presença do TGF- β reverte o metabolismo de arginina da produção de NO para a produção de poliaminas (Bauer et al., 2001). Essa reversão sugere que durante a infecção de macrófagos por *T. gondii* ocorre vantagem para o parasito, não somente pela inibição da produção de NO, mas também pelo possível aumento da produção de poliaminas que favorece o crescimento celular (Bauer et al., 2001). Essa hipótese foi testada, no entanto, a infecção de macrófagos por *T. gondii* não induziu aumento de poliaminas (Seabra et al., 2004b). Foi concluído que a quantidade de poliaminas existente nos macrófagos é suficiente para o crescimento de *T. gondii* (Seabra et al., 2004b).

Para melhor entender a importância da exposição de PS no mecanismo de evasão de taquizoítos de *T. gondii*, esses parasitos foram separados em subpopulações PS positivas e negativas (Dos Santos et al., 2011). Foi observado que somente a subpopulação que expõe PS (PS+) possui a capacidade de penetrar ativamente nas células e inibir a produção de NO ao contrário da subpopulação que não expõe PS (PS-) em sua superfície. Análises morfológicas revelaram que o VP de células infectadas com parasitos PS- possui grande área, indicando típico evento de fagocitose (Morisaki et al., 1995), ao passo que os vacúolos de células infectadas com PS+ eram menores o que caracteriza penetração ativa (Morisaki et al., 1995), sugerindo que esse mecanismo de entrada é PS dependente (Dos Santos et al., 2011).

Em macrófagos residentes o índice de infecção foi similar para as duas populações separadas, porém mais baixo quando comparado com a infecção com a população total (Dos Santos et al., 2011). O crescimento do parasito foi maior em macrófagos infectados com a população total quando comparado com os infectados com a população PS+ que apresentou índice intermediário e dos infectados com PS- onde o crescimento de *T. gondii* foi baixo (Dos Santos et al., 2011). A presença dessas subpopulações em conjunto aparentemente é importante para manutenção do equilíbrio no hospedeiro assegurando a sobrevivência do parasito e também do organismo infectado, sendo uma vantagem para a cepa virulenta RH (Dos Santos et al., 2011).

Em se tratando do conhecimento molecular dos mecanismos evasivos, o envolvimento do TGF- β é um dos mais descritos e comprovados. O TGF- β é uma molécula multifuncional que no sistema imunológico atua, dentre outras maneiras, desativando macrófagos (Tsunawaki et al., 1988). Esse mecanismo tem sido demonstrado em diversos parasitos como *Leishmania* (Barral-Netto et al., 1992), *Trypanosoma cruzi* (Ming et al., 1995), *Eimeria* (Jakowlew et al., 1997), *Plasmodium* (Vodovotz et al., 2004), além de *T. gondii* (Seabra et al., 2004a).

Foi relatado que a exposição de PS na superfície da *L. amazonensis* induz a produção do TGF- β em macrófagos infectados (de Freitas Balanco et al., 2001). O mesmo grupo demonstrou que amastigotas de *Leishmania* obtida de camundongos BALB/c (susceptível) e C57BL/6 (resistente) expõem PS de forma diferenciada, sendo que os parasitos obtidos de BALB/c expunham mais PS. A entrada na célula e a indução do TGF- β também era mais efetiva nesse grupo de leishmania (Wanderley et al., 2006). Portanto, a relação infectividade e exposição de PS em *L. amazonensis* não está ligada somente a presença de PS na superfície desse parasito, mas também na densidade de exposição que varia de acordo com a resposta do hospedeiro (Wanderley et al., 2006).

No entanto, no mesmo ano foi demonstrado que em promastigotas de *Leishmania major* somente os parasitos apoptóticos (expondo PS, mas em processo de morte celular) são capazes de inibir a ação microbicida de macrófagos (van Zandbergen et al., 2006). Em um trabalho mais recente foi observado que entre 30 e 50% da fase promastigota infectiva de *L. amazonensis* estão em apoptose e a taxa de infecção de camundongos aumenta quando são inoculados parasitos PS positivos juntamente com PS negativos em uma proporção de 50% de cada forma (Wanderley et al., 2009). Desse modo, a forma promastigota do parasito provavelmente se utiliza da capacidade de parte das células estarem em processo de morte celular (PS+) para inibir a produção de NO, permitindo a proliferação das formas PS negativas em um sistema de cooperação (Wanderley et al., 2009).

Em *L. amazonensis* isolados de pacientes com leishmaniose cutânea difusa, forma essa mais crônica e severa da doença, foi observado que os parasitos possuíam altos níveis de exposição de PS quando comparados com os parasitos obtidos de pacientes com leishmaniose cutânea, sendo inclusive mais infectivos (França-Costa et al., 2009). Portanto, o envolvimento da PS no mecanismo de evasão do gênero *Leishmania* está razoavelmente estabelecido.

Em *T. cruzi* a forma tripomastigota (liberada pelo vetor e que circula no sangue, portanto a mais infectiva) é a única que expõe PS e induz a translocação de Smad2 para o núcleo, induzindo a inibição da iNOS, o que sugere uma modulação autócrina da célula hospedeira dependente de TGF- β (DaMatta et al., 2007). O fato de outra forma infectiva do *T. cruzi*, a amastigota, não expor PS e conseqüentemente não inibir a produção de NO, sugere que outro mecanismo de evasão pode estar envolvido no sistema de invasão e proliferação desse parasito em célula hospedeira (DaMatta et al., 2007).

Marcadores de apoptose têm sido bastante estudados em *T. cruzi* e dependendo da densidade do parasito este evento pode regular o tamanho da população *in vitro* (Lüder et al., 2009). Esse comportamento parece ter sido favorecido durante a evolução contribuindo para a evasão do parasito do sistema imune do hospedeiro e aumentando a sua adaptação (Lüder et al., 2009). De certo modo, essa parece ser uma estratégia que evita a hiperparasitemia que poderia levar à morte do hospedeiro (Lüder et al., 2009).

Como relatado, taquizoítos de *T. gondii*, assim como a *Leishmania*, expõem PS e, aparentemente, é esta a molécula responsável pela indução do TGF- β pelos macrófagos infectados (Seabra et al., 2004a). Neste trabalho, viu-se ainda que os filamentos de actina dos macrófagos ativados se despolimerizam após a infecção e que existe o envolvimento do TGF- β neste processo, mas não se conhece ainda como se desenvolve este controle (Seabra et al., 2004a). Uma das possibilidades é a modulação de cascatas de sinalização intracelular do macrófago que alteram actina e que podem ser controladas pela infecção de *T. gondii*. A cepa virulenta RH possui subpopulações PS+ e PS- e são necessárias para a manutenção do balanço entre parasitos viáveis e inviáveis na célula hospedeira, o que parece trazer vantagens para essa cepa e para o hospedeiro (Dos Santos., et al., 2011).

Resultados preliminares de Seabra SH (comunicação pessoal) mostram que existe diminuição de proteínas fosforiladas, e de expressão de ERK-2, mas sem alteração de PI3 quinase em macrófagos infectados. Portanto, sabe-se que a infecção de *T. gondii* modula vias intracelulares dos macrófagos ativados, mas não se sabe até que ponto isto se dá via TGF- β , como no caso da inibição da produção de NO (Seabra et al., 2004a), ou se é um mecanismo independente. Afinal, a inibição da fusão de lisossomos com o VP contendo *T. gondii* é independente do

TGF- β (Seabra et al., 2004a). Portanto, este parasito tem múltiplas vias de modulação em macrófagos ativados.

1.7. IRGs e infectividade do *Toxoplasma gondii*

Proteínas “immunity related guanosine triphosphatases” (IRG) formam uma família de GTPases de camundongos bem definida, com peso molecular típico de 47 kDa, fortemente induzidas por interferon, especialmente IFN γ (Howard et al., 2011). Já foram relatados mais de 21 genes que codificam proteínas IRG em camundongos, porém não se sabe ao certo a sua quantidade total, que varia de acordo com o modelo experimental estudado (Bekpen et al., 2005).

As IRGs estão relacionadas a resistência a diversos patógenos desde Mycobacteria a *Leishmania* sendo responsáveis pela ruptura do vacúolo consequente degradação do parasito (Taylor et al., 2007). O modo como as IRGs atuam destruindo o VP ainda não está muito claro (Fentress et al., 2010). Sabe-se que a exposição de células de camundongo a IFN- γ induz a transcrição e biossíntese de um grande grupo de GTPases responsáveis por esse processo (Zhao et al., 2009a; Zhao et al., 2009b).

Em hospedeiros intermediários, *T. gondii* rapidamente, e ativamente, invade células nucleadas estabelecendo o VP e replicando após 12 horas de infecção. Se a célula hospedeira tiver sido ativada por IFN γ , passa a expressar proteínas IRGs que se acumulam na membrana do VP em poucos minutos após a invasão (Khaminets et al., 2010). Em 90 minutos ocorre um massivo acúmulo de múltiplas proteínas IRG. Esse carregamento é hierarquico e cooperativo com Irgb6 (e possivelmente também Irgb10) sendo as pioneiras Irga6 e Irgd (Khaminets et al., 2010).

Não se sabe ao certo o papel hierárquico das diversas IRGs no estabelecimento da defesa das células, porém a cooperação entre elas, provavelmente se dá para que não ocorra redundância genética no carregamento por proteínas IRG individuais. No final dessa fase a MVP é rompida. Esse rompimento é súbito destruindo a integridade do VP e expondo o parasito ao citosol (Howard et al., 2011). A membrana rompida forma vesículas que circundam o parasito, o qual apresenta morfologia comprimida e arredondada. Quando essa vesícula que circunda o parasito subitamente se rompe, o parasito libertado imediatamente readota o seu perfil de arco (Howard et al., 2011). Estas observações sugerem que a ação das proteínas IRG é circundar a MVP pressionando-a até a

membrana finalmente se romper pelo acúmulo de tensão, expondo o parasito aos sistemas de defesa do hospedeiro (Howard et al., 2011). Apesar de não se conhecer ao certo o mecanismo pelo qual as proteínas IRG atuam, sabe-se que a Irga6 se liga a MVP através de uma GTP e algumas características das IRGs as aproximam, por similaridade funcional, às dinaminas que são necessárias para a fusão e excisão de vesículas (Howard et al., 2011).

Aparentemente o sistema IRG parece proteger os camundongos nas infecções por linhagens de *T. gondii* do genótipo tipo II e III, porém não do tipo I (Howard et al., 2011). Isso se deve em parte à capacidade das cepas do tipo I em inibir o sistema IRG. A ligação inicial ao VP por proteínas IRG efetoras é extremamente reduzida e as sequelas típicas como a ruptura do vacúolo, morte do parasito e necrose celular são conseqüentemente limitadas (Howard et al., 2011).

No processo de invasão da célula hospedeira por *T. gondii* estão envolvidas organelas apicais especializadas (micronemas e róptrias) que secretam proteínas (Feng et al., 2010; Cheng et al., 2012). Essas proteínas são importantes no processo de formação do VP (Cheng et al., 2012) e por vezes são secretadas no citosol interagindo com os componentes celulares do hospedeiro (Cheng et al., 2012). Em especial a organela róptria possui muitas moléculas que são usadas pelos parasitos para entrar na célula hospedeira e subverter suas funções (Cheng et al., 2012). Proteínas das róptrias alcançam a superfície da membrana do VP via rede de membranas tubovesiculares que são relativamente simples com poucas organelas subcelulares. A liberação dessas proteínas dentro da célula hospedeira é um importante fator para a formação de um nicho intracelular protegido para o parasito crescer e replicar (Cheng et al., 2012). Essas proteínas secretadas pelas róptrias são a primeira contribuição de fato no entendimento do fenótipo de virulência aguda das cepas de genótipo tipo I, sendo a ROP18 uma das principais (Howard et al., 2011; Cheng et al., 2012).

Genes de infectividade têm sido relacionados à codificação de membros da família de quinases polimórficas secretadas pelas róptrias (ROP quinases) (Behnke et al., 2011). Um dos locus responsáveis pela variação da virulência foi relacionado como responsável pela expressão da proteína ROP5. Quando se retira o locus inteiro responsável pela ROP5 na cepa RH (tipo I), ela torna-se atenuada demonstrando a importância da codificação dessa molécula para o processo de infectividade desses parasitos (Behnke et al., 2011). Novos estudos, porém, devem

explorar outros alelos que influenciam na virulência das diferentes cepas (Behnke et al., 2011).

Apesar de não ter sido visto no estudo de Behnke e colaboradores (2011) uma relação direta entre infectividade e a ação de outras serina treonina quinases, já está bem estabelecido o papel das ROP18 e ROP16 no processo de evasão do parasito dos mecanismos de defesa dos hospedeiros (Zhao et al., 2009a; Lim et al., 2012). A interação entre diversas serinas/treoninas quinases no processo infectivo de diferentes cepas de *T. gondii* não pode ser descartada (Behnke et al., 2011).

A expressão dos genes codificantes de ROP18 da cepa GT-1 (genótipo tipo I, virulenta) na cepa CTG Ble (tipo III, avirulenta), torna essa cepa virulenta. O mecanismo de ação da ROP18 do tipo I se baseia na fosforilação da proteína microbicida Irgb6, inibindo o recrutamento de GTPases para o VP e impedindo a eliminação do parasito (Feng et al., 2010). O mecanismo de defesa das células hospedeiras através da Irgb6 funciona para parasitos não virulentos, que são destruídos. Porém em cepas virulentas isso não ocorre, o que estaria relacionado à presença da ROP18 (Fentress et al., 2010; Feng et al., 2010; Cheng et al., 2012). Mais recentemente foi demonstrado que a ROP18 se liga ao fator de transcrição ATF6 do retículo endoplasmático do hospedeiro. ROP18 se associa com ATF6b com o objetivo de marcá-lo para a degradação dependente do proteossomo, aumentando a virulência do parasito (Cheng et al., 2012).

Outros estudos indicam que no processo de invasão a ROP18 é secretada diretamente para o citosol da célula hospedeira e apresenta tropismo para a face citosólica da membrana do VP onde as proteínas IRG são montadas. As proteínas IRG são fosforiladas tendo como alvo dois resíduos de treonina conservados na região *switch* I do domínio de ligação do nucleotídeo. Mutações em qualquer um desses resíduos em Irga6 como a alanina ou ácido aspártico, destrói a atividade enzimática da proteína IRG, incluindo sua habilidade em localizar a membrana do VP (Howard et al., 2011).

A ROP18 é altamente expressa na cepa tipo I respondendo por mais de 90% da extrema virulência genotípica dessa linhagem; a sua expressão também contribui para os níveis intermediários de virulência do tipo II (Cheng et al., 2012). Apesar da ROP18 ser um candidato natural responsável pela proteção do parasito contra o sistema IRG, a expressão do alelo responsável pela ROP18 de cepa tipo I em cepa avirulenta (tipo III) não conferiu uma defesa contra a atividade da IRG, sugerindo

que outra molécula polimórfica sintetizada pela rópria do parasito virulento estaria envolvida (Zhao et al., 2009a; Fentress et al., 2010), podendo inclusive ser outro tipo de ROP, como a ROP5 (Howard et al., 2011).

Interações entre fatores de virulência epistáticos revelados pela recuperação da alta virulência ao se cruzarem cepas do tipo II e III em hospedeiros definitivos, mostra que o sistema de virulência é complexo, com virulência diferencial resultante da interação entre produtos alélicos de dois ou mais loci polimórficos (Howard et al., 2011). Além disso, o papel das ROP quinases parece não se restringir somente a interação com o sistema IRG. A ROP16 participa no processo de virulência, entretanto, foi recentemente demonstrada como responsável também por ativação constitutiva de vias de citocinas reguladoras (Howard et al., 2011; Lim et al., 2012).

A marcação das diferentes IRGs através de anticorpos pode ser uma ferramenta eficaz para se entender e relacionar tais ações com outros mecanismos de defesa do hospedeiro como a exposição de PS, a produção de NO e presença ou ausência de diferentes ROP quinases, o que torna uma cepa virulenta e outra não, além de resistências intermediárias a ação do sistema imune. Provavelmente diversos mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro atuem em conjunto na caracterização da infectividade e nas manifestações clínicas das diferentes cepas de *T. gondii*. Relacionar esses mecanismos pode auxiliar no combate a essa doença e no entendimento dos mecanismos de ação de outros protozoários.

2.0. Objetivo Geral

O presente trabalho objetiva investigar a relação entre a exposição de fosfatidilserina (PS) de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, de cepas com diferentes graus de virulência para camundongo, e o mecanismo de evasão a macrófagos ativados.

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1- Correlacionar infecção, desenvolvimento e persistência de taquizoítos das cepas do tipo I (RH), II (ME-49) e III (VEG) e recombinante (P-Br) com a inibição da produção de NO e expressão de iNOS em macrófagos ativados;
- 2.1.2- Investigar o envolvimento do TGF- β no mecanismo de evasão das diferentes cepas após a infecção em macrófagos ativados;
- 2.1.3- Analisar os níveis de exposição de PS nos taquizoítos das diferentes cepas;
- 2.1.4- Verificar se autofagia está envolvida na destruição de cepas menos virulentas após infecção em macrófagos ativados.

3.0. Materiais e métodos

3.1. Macrófagos e ativação

Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem do peritônio de camundongos Swiss machos (5 semanas) com 5 mL de solução de Hank. Os macrófagos foram plaqueados em lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após 1 hora de aderência em estufa a 37°C com 5 % de CO₂, as células foram lavadas e cultivadas com "Dulbeccos Modified Eagle's Medium" (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Células foram ativadas com 100U/mL de interferon- γ recombinante de camundongo (IFN- γ , Sigma) e 100 ng/mL de lipopolissacarideo de *Escherichia coli* (0111: B4 LPS, Sigma) (Seabra et al., 2002). Esse estudo foi realizado de acordo com as leis brasileiras nº 11794/08. O protocolo de estudo animal foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UENF (número de permissão 98)

3.2. Parasitos e animais

Taquizoítos de ME-49, P-Br e VEG foram mantidos por sucessivas passagens em células Vero. Células Vero com altas taxas de infecção foram lavadas para a eliminação de parasitos livres, raspadas e mecanicamente rompidas através da passagem em seringa e agulha de 26G, para a liberação de taquizoítos. A suspensão celular foi centrifugada a 500 x g e o sobrenadante foi passado em filtro de 3 μ m.

Taquizoítos da cepa RH foram obtidos por lavado peritoneal em camundongos infectados. A suspensão de células foi centrifugada a 100 x g por 5 min a 4° C para remover restos celulares e leucócitos peritoneais. O sobrenadante contendo taquizoítos foi coletado e centrifugado a 1000 x g por 10 min a 4° C. Parasitos foram resuspensos em DMEM.

3.3. Infecção *in vitro* e quantificação da infecção e persistência parasitária

Macrófagos ativados e cultivados por 24 h foram lavados e as interações foram realizadas por 2 h a 37 °C a taxa de 10:1 *T. gondii* por macrófago. As células foram então lavadas com solução de Hank e acrescidas de DMEM com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL IFN- γ , e 100 ng/mL de LPS, para cultivo por 24 e 48 h. Para quantificação da infecção (2 h) e persistência do parasito (24, 48 e 96 h) em

macrófagos, as células foram fixadas em PBS contendo 3% formaldeído, lavadas e coradas com solução de Giemsa 1:10 por 10 min, desidratadas em solução de acetona-xilol, montadas em Entellan e observadas ao microscópio óptico Zeiss Axioplan utilizando a objetiva de 100 x em óleo de imersão. Imagens foram capturadas com câmera digital AxioCam MRc5 e processadas no programa Axiovision. As células coradas foram analisadas seguindo os seguintes parâmetros: a) percentual de macrófagos com parasitos (%), b) número médio de parasitos por macrófago. Um mínimo de 200 macrófagos por lamínula foram contados em triplicata para cada experimento individual conforme Dos Santos e colaboradores (2011).

3.4. Análise da produção de óxido nítrico

A produção de NO foi avaliada indiretamente pela leitura colorimétrica do nitrito, nos diferentes sobrenadantes das culturas, através do uso do reagente de Griess. Os sobrenadantes foram combinados na proporção de 1:1 com o reagente de Griess (1 volume de 1% de sulfanilamida em 5% de ácido ortofosfórico em água deionizada com volume igual de 0,1% de N-[1-naftil] Etilenodiamina em água deionizada). Após 10 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (540 nm) e a quantificação da produção de NO foi baseada em curva padrão feita com quantidades de nitrito de sódio definidas, diluídas no meio de cultura (Green *et al.*, 1982).

3.5. Avaliação da viabilidade de taquizoítos de *T. gondii*

Após 2, 24, 48 e 96 h da infecção de *T. gondii* em macrófagos peritoneais de camundongos, as células de três poços da placa de 24 poços foram raspadas (para a liberação de taquizoítos) em 1 mL de PBS a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo células foi passado 10 vezes em seringa com agulha de 26G e inoculado em três camundongos (3 semanas de idade). A taxa de sobrevivência dos camundongos foi monitorada diariamente. Camundongos em estado moribundo foram eutanasiados em câmara de CO₂.

3.6. Imunofluorescência

Para imunofluorescência, macrófagos peritoneais ativados 24 h antes da interação foram infectados com *T. gondii* (cepas RH ME-49) e cultivados por 2 h, em lamínulas e coletados após 2, 6, 24 e 48 h. As células foram lavadas e fixadas em

paraformaldeído 3% recém preparado em PBS, lavado em solução tampão de PBS e incubadas em 0,5% de Triton. As lamínulas contendo as células foram incubadas com 10 mM de cloreto de amônio em PBS e lavadas em PBS-BSA. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo policlonal de camundongo que reconhece *T. gondii*, diluído em uma razão de 1:5000 em PBS-BSA, e anticorpo policlonal de coelho contra iNOS (M 19, Santa Cruz Biotechnology) ou Smad2 fosforilada (# 3101, Cell Signaling Technology) ou LC3A (L8793, Sigma) os três diluídos a 1:200 em PBS-BSA. Células foram lavadas com PBS e com PBS-BSA, incubadas com anticorpo secundário contra camundongo marcado com TRITC diluído a 1:400 e com anticorpo secundário contra coelho marcado com FITC diluído a 1:100 em PBS-BSA, lavadas com PBS e montadas em ProLong Gold. Para a marcação da Smad2 fosforilada o mesmo procedimento foi realizado porém utilizando anticorpo de coelho anti Smad2 na diluição de 1:100 em PBS-BSA e com anticorpo secundário contra coelho marcado com FITC diluído 1:50 em PBS-BSA e o material foi observado em microscópio Zeiss Axioplan equipado com contraste diferencial de interferência e iluminação epifluorescente e lâmpada de mercúrio HBO100.

3.7. Exposição de fosfatidilserina

Taquizoítos recentemente obtidos foram lavados com tampão de ligação de anexina (HEPES 10mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 2,5mM) pH 7,3 e incubados com anexina-V FITC (1µg/10⁵ células), para marcação de exposição de PS, e iodeto de propídio (10 µg/mL), marcação de células mortas, por 1 h em temperatura ambiente. Os controles foram realizados utilizando taquizoítos mortos pelo calor ou incubando parasitos em PBS sem Ca²⁺, contendo 5mM de EGTA. Após a incubação, taquizoítos foram avaliados em citômetro de fluxo BD Xcalibur e os resultados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.9.

3.8. Análise dos dados

Os dados obtidos foram compilados na forma de médias e desvios padrões das médias baseadas em determinações realizadas em pelo menos 3 repetições. Para as análises estatísticas foi realizado Teste *t* de Student para avaliar a significância dos resultados, utilizando $p < 0,05$.

4.0. Resultados

4.1. Análise morfológica de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* e viabilidade das cepas RH, ME-49, P-Br e VEG em macrófagos ativados

Taquizoítos da cepa RH co-cultivado em macrófagos após 24 e 48 horas de infecção apresentam uma morfologia que indica parasitos viáveis (Figuras 2 A e B). No entanto, taquizoítos das cepas ME-49 e P-Br exibiram morfologia alterada provavelmente devido à digestão (Figura 2 C, E). Após 48 h de infecção estruturas intracelulares semelhante a taquizoítos digeridos foram observados dentro dos macrófagos com ME-49 e P-Br (Figura 2 D, F). Taquizoítos da cepa VEG persistiram em macrófagos ativados após 24 h (Figura 2 G) e alguns foram observados após 48 h de infecção (Figura 2 H). Entretanto, em 48 h taquizoítos de RH (Figura 2 B) foram mais facilmente observados do que os de VEG (Figura 2 H).

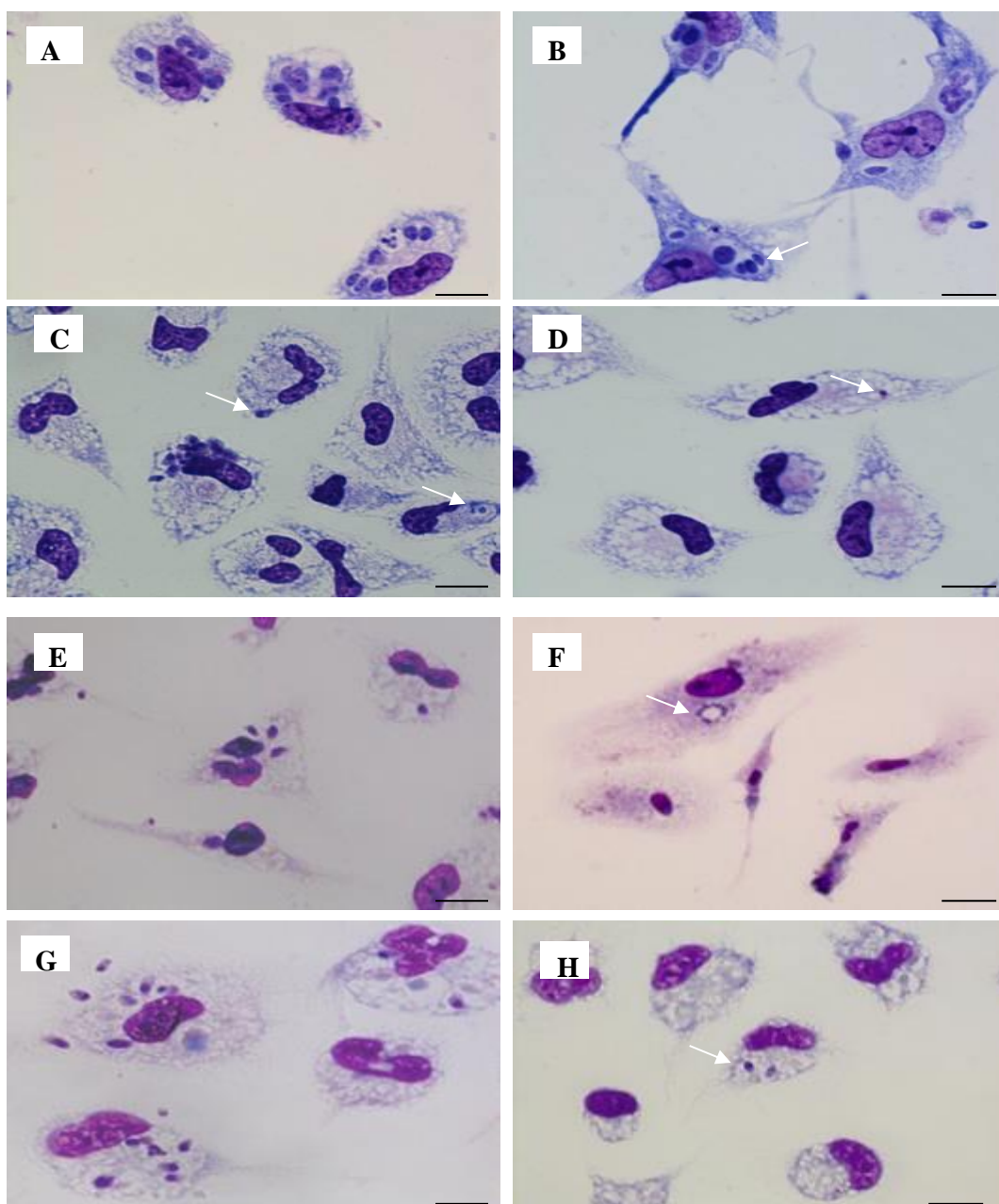


Figura 2: Imagens de campo claro de macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* de diferentes cepas corados com Giemsa. Macrófagos após 24 h de infecção com *T. gondii* das cepas RH (A), Me-49 (setas) (C), P-BR (E) e VEG (G). Macrófagos após 48 h de infecção com *T. gondii* cepas (seta) RH (B), Me-49 (D), P-BR (F) e VEG (H). Tachizoítos de RH apresenta morfologia preservada após 48 h de persistência. Barras: 5 μ m. Imagens representativas de cinco experimentos independentes.

4.2. Avaliação da entrada, persistência, desenvolvimento e viabilidade de taquizoítos

Para melhor compreender a persistência da infecção provocada por diferentes cepas de *T. gondii* utilizadas neste trabalho, a quantificação da porcentagem de macrófagos infectados e do número médio de *T. gondii* internalizados foi realizada. A entrada de taquizoítos das diferentes cepas em macrófagos foi verificada após 2 h de interação. Taquizoítos de RH apresentaram o menor valor de entrada na população de macrófagos; as outras três cepas examinadas tiveram uma entrada similar e maior que RH (Tabela 1). Taquizoítos de RH foram capazes de persistir em macrófagos ativados, como visto pela manutenção da porcentagem de macrófagos infectados e o número médio de *T. gondii* internalizado após 48 h (Tabela 1). A capacidade de persistência de VEG diminuiu após 24 e 48 h de infecção, mas foi mais elevada quando comparada com ME-49 e P-Br (Tabela 1). ME-49 e P-Br não persistem e praticamente desaparecem dos macrófagos ao longo do tempo, como indicado pelos parâmetros mostrados na tabela 1.

Para determinar se taquizoítos de *T. gondii* que persistiram em macrófagos ativados ainda eram capazes de matar camundongos, parasitas extraídos mecanicamente de macrófagos em diferentes tempos de infecção foram inoculados em camundongos. Taquizoítos de RH recuperados após 2, 24 e 72 h mataram todos os 3 camundongos entre 6-8 dias após a infecção; após os taquizoítos recuperados após 48 ou 96 h mataram 2 camundongos após 9 dias de infecção e 1 camundongo sobreviveu durante o período examinado (Figura 3). Uma vez que as outras três cepas são menos virulentas do que RH, e se encistam, os camundongos que receberam taquizoítos recuperados destas cepas tiveram seus cérebros examinados quanto à presença de cistos. Foram encontrados cistos em 1 camundongo inoculado com taquizoítos de ME-49 e em 1 outro inoculado com P-Br recuperados após 2 h de infecção. Cistos de VEG foram encontrados em 2 camundongos após 2 h e em 1 camundongo após 24 h de infecção de macrófagos. Nas três cepas avaliadas não foram encontradas cistos nos cérebros dos camundongos após os tempos citados acima.

Tabela 1. Entrada e persistência de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* cepas RH, ME-49, P-Br e VEG em macrófagos ativados.

Macrófagos ^a	Horas pós infecção	RH	ME-49	P-Br	VEG
Porcentagem de macrófagos infectados	2	29,0±5,71 ^b	62,5±5,32 ^c	56,0±2,38 ^c	68,4±1,65 ^c
	24	24,8±6,22	5,9±1,56 ^c	7,4±2,17 ^c	15,2±0,42 ^{c,d}
	48	21,1±3,00	1,0±0,02 ^c	3,9±0,34 ^c	8,7±1,05 ^{c,d}
Número médio de <i>T. gondii</i> internalizado	2	1,4±0,32	1,2±0,03	1,32±0,12	1,9±0,22
	24	1,7±0,09	1,5±0,21	1,3±0,11	1,4±0,01
	48	2,4±0,54	0,3±0,26	1,0±0,53	1,0±0,25

a Macrófagos foram ativados 24 h antes das interações, infectados com diferentes cepas de *T. gondii* por 2 h, células foram lavadas e cultivadas por 24 e 48 h. A entrada (2 h) e persistência (24 e 48 h) dos parasitas foi avaliada.

b Valores são médias ± e desvio padrao da media de seis experimentos independentes.

c Diferença significativa ($P < 0.05$) para os respectivos valores de macrófagos infectados com RH foi calculado pelo teste t de Student.

d Diferença significativa ($P < 0.05$) para os respectivos valores de macrófagos infectados com P-Br e VEG foi calculado pelo teste t de Student.

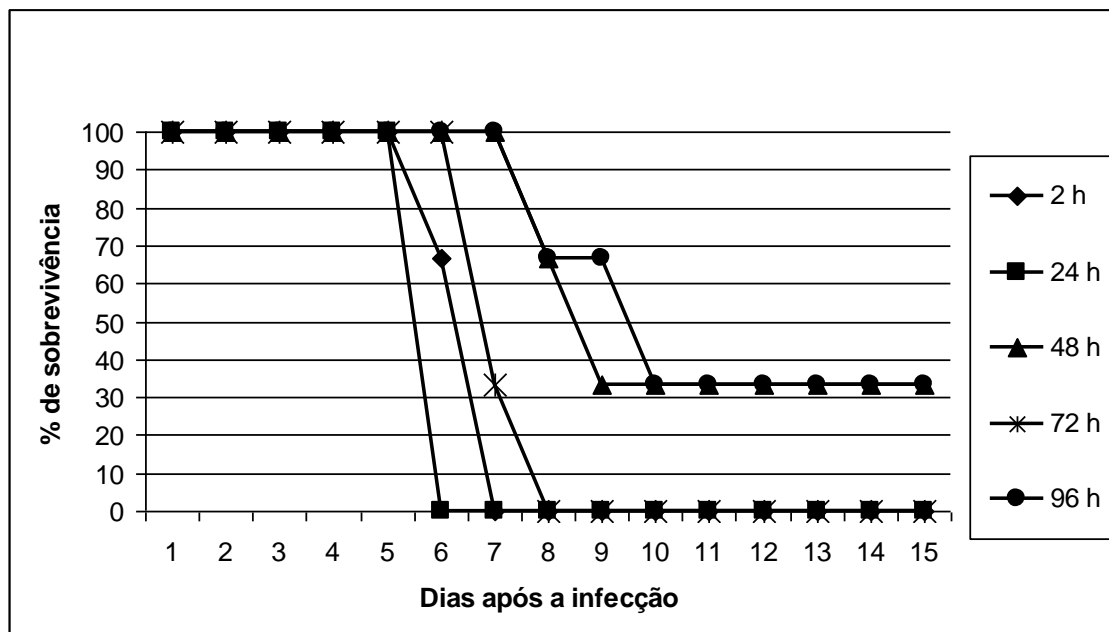


Figura 3: Taxa de sobrevivência de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) recuperado de macrófagos peritoneais de camundongos infectados após 2, 24, 48, 72 e 96 h de interação. Sobrenadante de macrófagos infectados e rompidos foram inoculados em três camundongos (3 semanas de idade) e sua taxa de sobrevivência monitorada.

4.3. Produção de nitrito e expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados e infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* das cepas RH, ME-49, P-Br e VEG

A produção de NO foi inibida por taquizoítos das cepas RH após 24 e 48 horas de infecção e em menor medida pela cepa VEG (Tabela 2). Taquizoítos de ME-49 e P-Br foram capazes de inibir a produção de NO por macrófago em 24 h, mas tal inibição foi duas vezes mais baixa do que a de RH (Tabela 2). Após 48 h de infecção, as cepas ME-49 e P-Br não foram capazes de inibir a produção de NO. Além disso, os macrófagos infectados por ME-49 e P-Br produziram mais NO em comparação com macrófagos não infectados, após 48 h de infecção (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de nitrito de macrófagos peritoneais de camundongo ativados e infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* das cepas RH, ME-49, P-Br e VEG

Macrófagos ^a	Produção de nitrito (μM)			
	24 h	% inibição 24 h	48 h	% inibição 48 h
Não infectado	31,6 \pm 1,62 ^b	-	38,3 \pm 0,88 ^b	-
<i>T. gondii</i> RH	10,7 \pm 1,00 ^c	66,1	19,4 \pm 0,20 ^c	49,4
<i>T. gondii</i> ME-49	21,3 \pm 0,61 ^{c,d,e}	32,6	45,6 \pm 1,25 ^c	0
<i>T. gondii</i> P-Br	20,1 \pm 5,75 ^{c,d}	36,4	42,4 \pm 5,20 ^c	0
<i>T. gondii</i> VEG	14,7 \pm 2,14 ^c	53,5	20,9 \pm 0,67 ^{c,d}	45,5

a Macrófagos foram ativados 24 h antes da interação e expostos a infecção com diferentes cepas de *T. gondii* por 2 h; células foram lavadas e cultivadas por 24 e 48 h.

b Valores são médias \pm desvio padrão da média de 4 experimentos independentes.

c Diferença significativa ($P < 0.05$) para os respectivos valores comparados com macrófagos não infectados foi calculado pelo teste t de *Student*.

d Diferença significativa ($P < 0.05$) para os respectivos valores comparados com macrófagos infectados com RH foi calculado pelo teste t de *Student*.

e Diferença significativa ($P < 0.05$) para os respectivos valores comparados com macrófagos infectados com VEG foi calculado pelo teste t de *Student*.

4.4. Localização de óxido nítrico sintase induzida e taquizoítos em macrófagos ativados e infectados

Ensaio de imunofluorescência indicaram que taquizoítos de todas as cepas avaliadas inibiram a expressão de iNOS em macrófagos após 2 h de infecção (Figura 4 B, C, D, E) quando comparados com macrófagos não infectados (Figura 4 A). Macrófagos infectados com taquizoítos possuíam baixa expressão de iNOS em contraste com as células vizinhas não infectadas (Figura 4 B, C, D, E). Após 6 h de infecção alguns parasitos de ME-49 foram observados no interior de macrófagos e possuíam produção intermediária de iNOS (Figura 4 H). Neste mesmo tempo P-Br e VEG também inibiram iNOS (Figura 4 I e J), mas essa inibição não foi tão intensa quando comparada com RH (Figura 4 G). Além disso alguns parasitos de RH duplicaram e foram capazes de inibir a expressão de iNOS (Figura 4 G). Após 24 h de infecção macrófagos infectados com RH não expressaram iNOS (Figura 4 L). Em macrófagos infectados com ME-49 e P-Br foram observados antígenos de *T. gondii* assemelhando-se a parasitos digeridos, recuperando a expressão de iNOS (Figura 4 M, N). Taquizoítos de VEG mantém a capacidade de inibição da expressão de iNOS após 24 h de infecção, porém os taquizoítos não se replicam (Figura 4 O). Após 48 h de infecção macrófagos infectados com RH apresentam taquizoítos com morfologia de parasitos viáveis, alguns com replicação, e capaz de inibir a expressão de iNOS em macrófagos (Figura 4 Q). Em contraste, alguns macrófagos com antígenos de VEG expressam iNOS e não foram observados duplicação de taquizoítos (Figura 4 T). Macrófagos infectados com ME-49 e P-Br recuperaram a expressão de iNOS e restos de parasitos foram raramente observados na população de macrófagos (Figura 4 R, S).

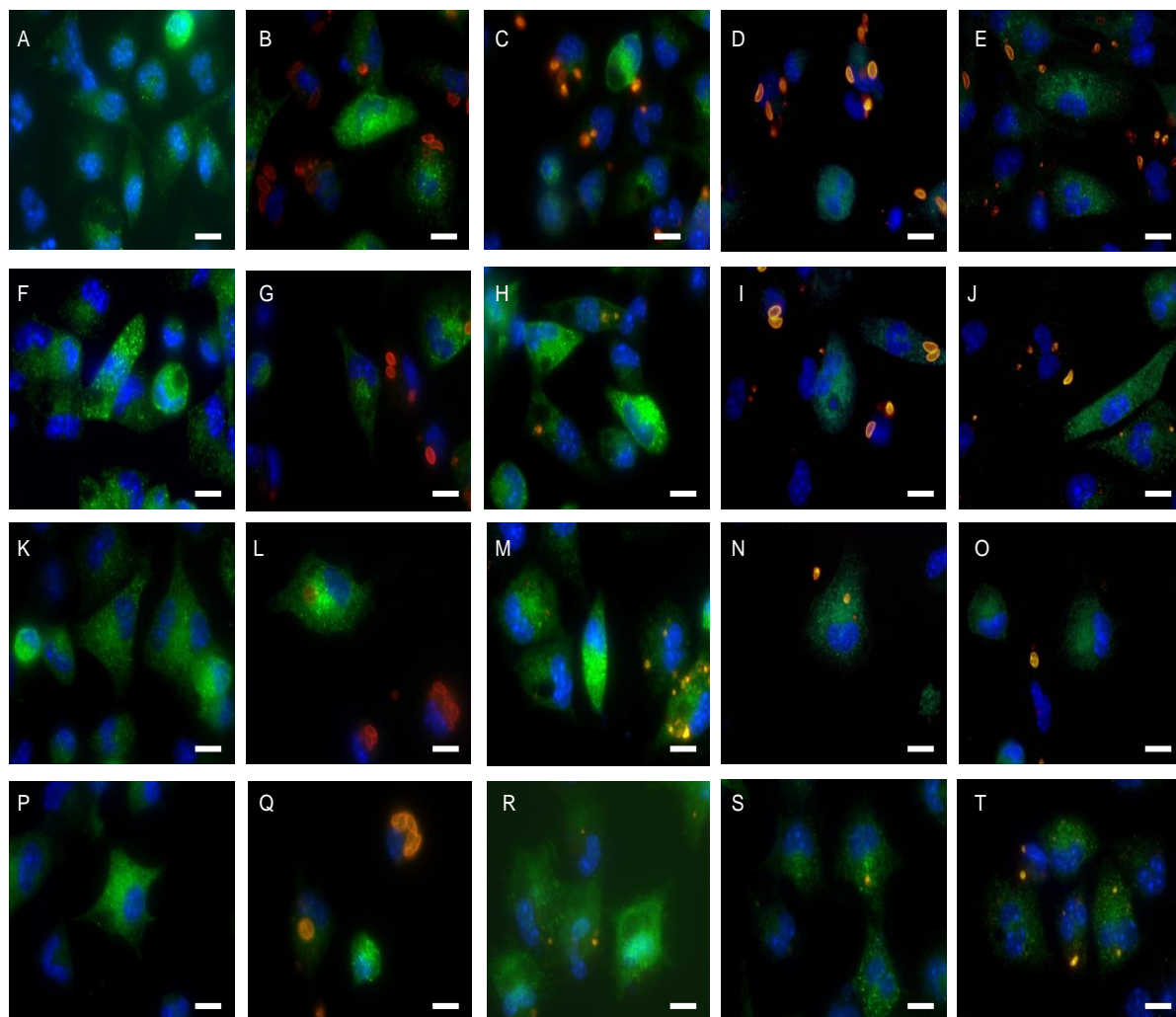


Figura 4: Imunofluorescência da expressão iNOS (verde) e *Toxoplasma gondii* (vermelho) em macrófagos infectados, núcleos marcados (azul). Macrófagos após 2 h sem infecção (A) ou após infecção com RH (B), ME-49 (C), P-Br (D), e VEG (E). Macrófagos infectados apresentam clara redução na expressão de iNOS. Macrófagos após 6 h sem infecção (F) ou após infecção com RH (G), ME-49 (H), P-Br (I), e VEG (J). Macrófagos infectados com ME-49 (seta) apresentam níveis intermediários de expressão de iNOS. Macrófagos após 24 h sem infecção (K), ou após infecção com RH (L), ME-49 (M), P-Br (N) e VEG (O). Macrófagos após 48 h sem infecção (P) ou após infecção com RH (Q), ME-49 (R), P-Br (S) e VEG (T). Bars: 10 μ m. Imagens representativas de quatro experimentos independentes.

4.5. Localização de SMAD 2 fosforilada (PS2) e taquizoítos em macrófagos ativados e infectados

Macrófagos não infectados, independentemente do tempo observado, apresentaram baixo sinal de fluorescência para PS2 translocado para os núcleos (Figura 5 A, a, F, f, K, k). Após 2 h de infecção com todas as cepas avaliadas, PS2 foi localizada no núcleo de macrófagos infectados (Figura 5 B, b, C, c, D, d, E, e); translocação nuclear de PS2 persiste após 6 e 24 h de infecção de macrófagos por RH (Figura 5 G, g, L, l). Os macrófagos infectados com a ME-49 e P-Br não apresentaram translocação nuclear de PS2 após 6 e 24 horas de infecção (Figuras 5 H, h; M, m, I, i, N, n), ao passo que VEG induz translocação nuclear de PS2 em 6 h (Figura 5 J, j), no entanto, a intensidade do sinal foi mais baixa quando comparado com RH; em 24 h não foi observado PS2 translocado para o núcleo de macrófagos infectados com VEG (Figura 5 O, o).

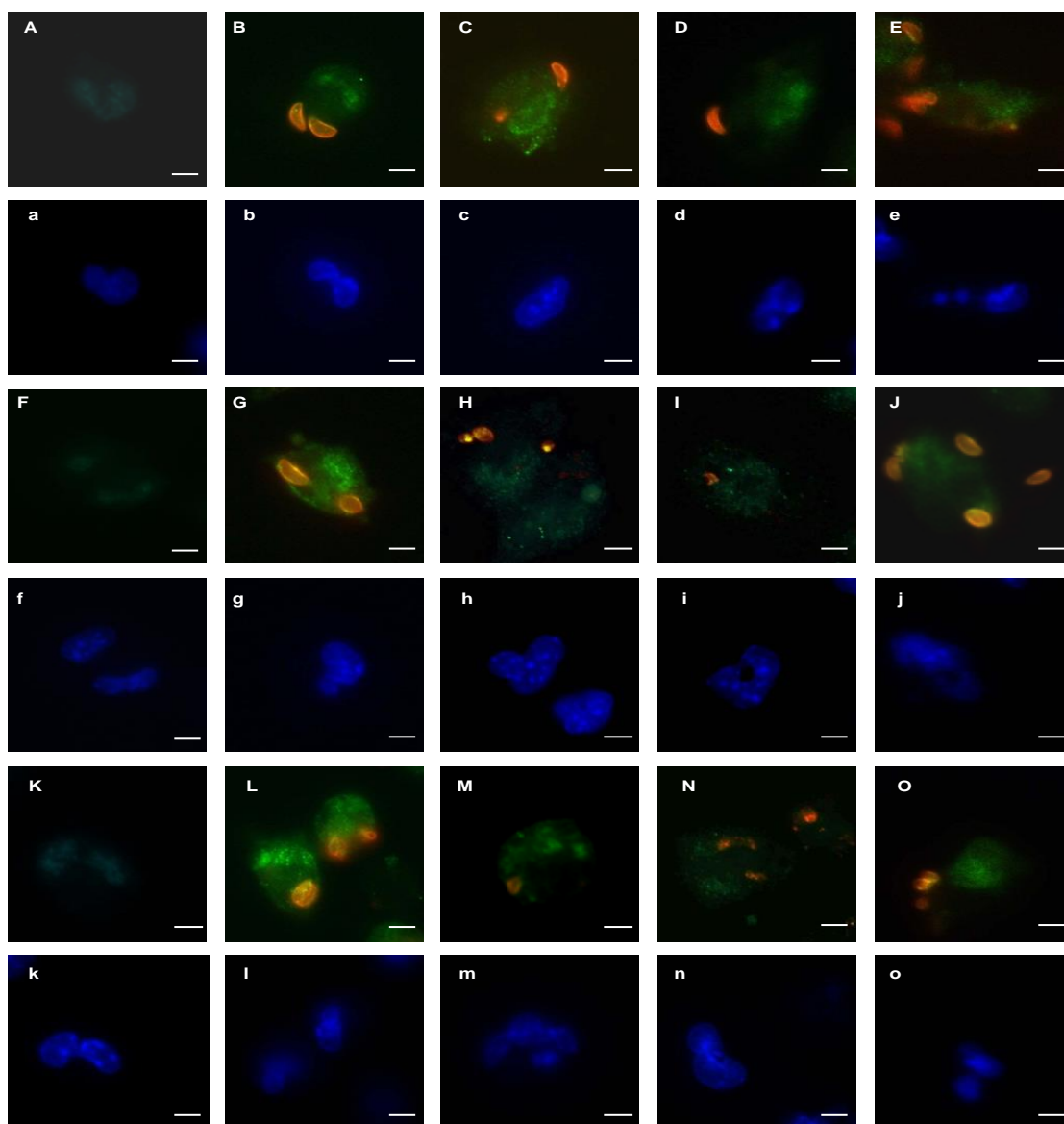


Figura 5. Imunofluorescência de SMAD2 fosforilada (verde) e *Toxoplasma gondii* (vermelho) em macrófagos infectados núcleos marcados (azul). Macrófagos após 2 h sem infecção (A,a) e após infecção com RH (B,b), ME-49 (C,c), P-Br (D,d), e VEG (E,e). Macrófagos após 6 h sem infecção (F,f) e após infecção com RH (G,g), ME-49 (H,h), P-Br (I,i), e VEG (J,j). Macrófagos após 24 h sem infecção (K,k), e após infecção com RH (L,l), ME-49 (M,m), P-Br (N,n), e VEG (O,o). As letras em minúsculo correspondem a marcação do núcleo celular com DAPI (azul) correspondente das letras em maiúsculo. Barras: 10 μ m. Imagens representativas de três experimentos independentes.

4.6. Avaliação da exposição de fosfatidilserina produção de citocinas pelas cepas RH, ME-49, P-Br e VEG através de citometria de fluxo

Para relacionar a inibição na expressão de iNOS e da produção de NO com a exposição de PS, taquizoítos de *T. gondii* de RH, ME-49, P-Br e VEG foram analisadas por citometria de fluxo. A cepa RH possui a população que menos expõe PS, seguindo-se VEG, P-Br e ME-49 (Figura 6 A). A intensidade média de fluorescência seguiu um padrão semelhante a porcentagem de células positivas para PS nas cepas avaliadas, com o valor mais elevado para o ME-49 (Figura 6 B)

Infecção de macrófagos com as distintas cepas estimulou diferencialmente a produção de citocinas. RH e VEG aumentaram a produção de IL-10 e reduziram a de IL-12. No entanto, a infecção com ME-49 e P-Br induziu comportamento contrário, com diminuição de IL-10 e e aumento de IL-12 (dados não mostrados).

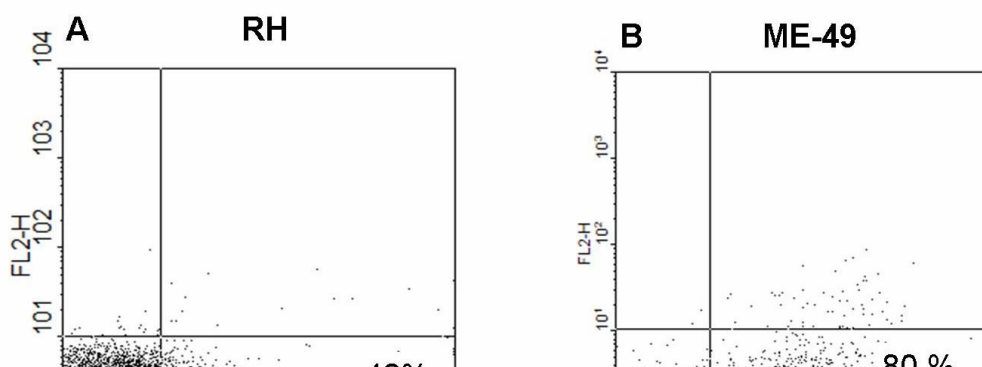


Figura 6. Exposição de fosfatidilserina (PS) por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* de diferentes cepas. Gráfico Dot-plot para anexina-V marcada (eixo-x) e iodeto de propídio (eixo -y) indicando parasitos vivos de diferentes cepas. Números dentro do gráfico dot-plot indicam a média de intensidade de fluorescência da população PS positiva. Dados representativos de três experimentos independentes.

4.7. Localização de marcador de autofagia LC3 em macrófagos ativados e infectados

O marcador de autofagia LC3 foi observado em alguns pontos dos macrófagos ativados não infectados em todos os tempos avaliados (Figura 7 A, F e K), indicando a presença de vesículas autofágicas. Após 2 h de infecção não se observaram marcações de vesículas autofágicas ao redor dos parasitos nas diferentes cepas avaliadas (Figura 7 B, C, D e E), especialmente em RH. Em 6 h não se observa marcação ao redor dos taquizoítos de RH (Figura 7 G). Entretanto, vesículas autofágicas podem ser observadas ao redor de taquizoítos de ME-49 (Figura 7 H) e de P-Br (Figura 7 I) e de alguns parasitos de VEG (Figura 7 J). Após 24 h de infecção, taquizoítos de RH e VEG são observados sem a presença de vesículas autofágicas (Figura 7 L e O, respectivamente). Ao passo que parasitos de ME-49 e P-Br estão circundadas por essas vesículas (Figura 7 M e N, respectivamente).

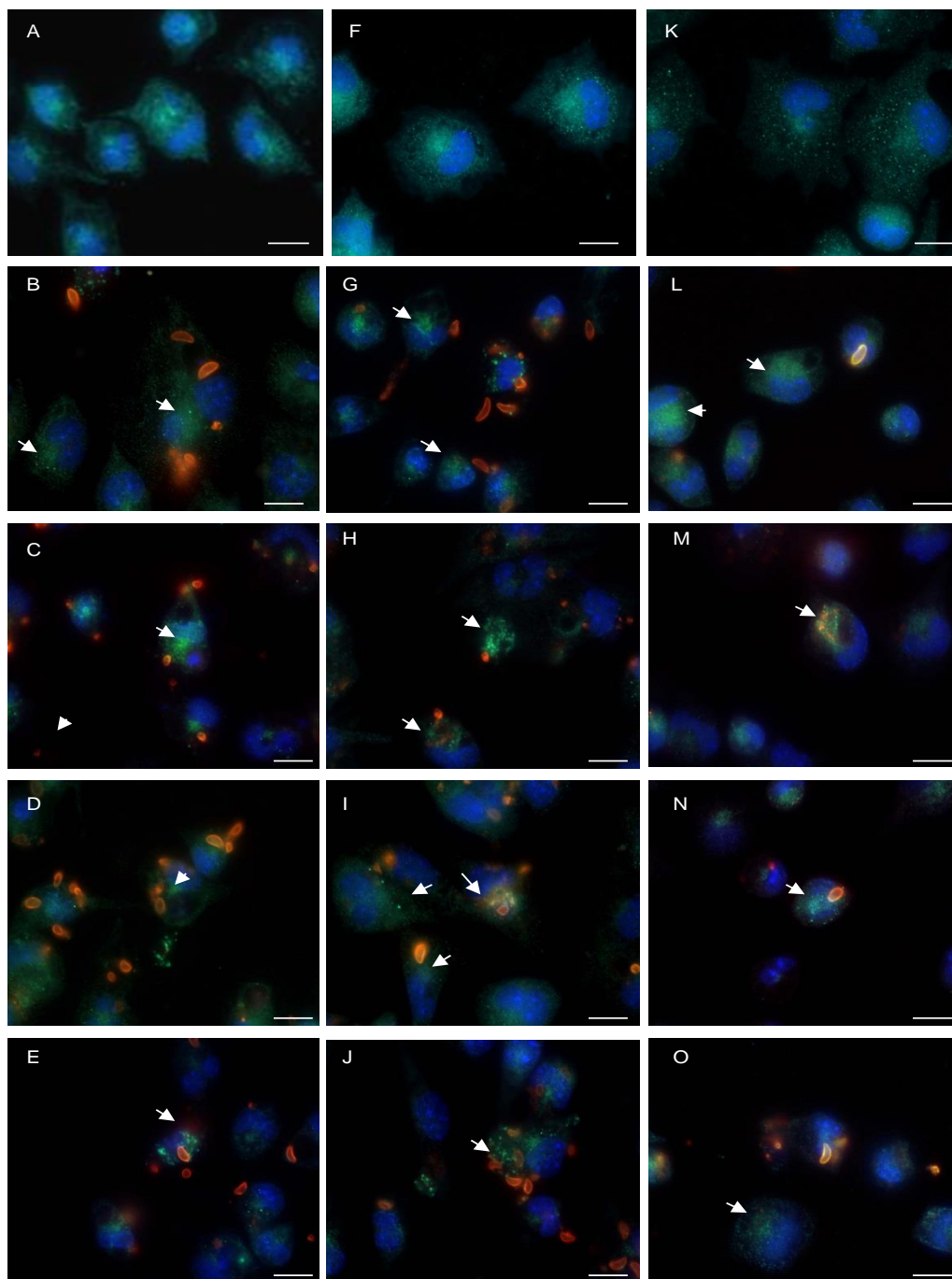


Figura 7: Imunofluorescência de LC3 (verde), taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (vermelho), e núcleo (azul) em macrófagos infectados. Macrófagos após 2 h sem infecção (A) e infectados com as cepas RH (B), ME-49 (C), P-Br (D) e VEG (E). Macrófagos após 6 h sem infecção (F) e infectados com as cepas RH (G), ME-49 (H), P-Br (I) e VEG (J). Macrófagos após 24 h sem infecção (K) e infectados com as cepas RH (L), ME-49 (M), P-Br (N) e VEG (O). As setas indicam a marcação em verde de vesículas autofágicas. Barras: 10 μ m. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

5.0. Discussão

Toxoplasma gondii assim como outros membros do filo apicomplexa é um parasito intracelular obrigatório, sendo particularmente um dos mais bem sucedidos (Dubey e Frenkel, 1998), pois consegue invadir praticamente todas as células nucleadas de animais vertebrados endotérmicos (Werk, 1985). O parasito se replica por endogenia e posteriormente rompe a célula reinfectando outras células nucleadas. O processo utilizado pelo parasito de burlar o sistema microbicida de células hospedeiras tem sido alvo de diversos estudos na área de parasitologia (Dubey e Frenkel, 1998; Boyle e Radke, 2009).

Para ser bem sucedido em seu processo infectivo *T. gondii* precisa invadir ativamente a célula hospedeira (Morisaki et al., 1995) e montar um compartimento especializado, conhecido como VP, que evita a fusão com os compartimentos ácidos da célula hospedeira (Jones e Hirsch, 1972; Sibley et al., 1985). A penetração ativa e a montagem do VP refratário as defesas do hospedeiro é de fundamental importância para o sucesso do processo infectivo (Morisaki et al., 1995).

Apesar do conhecimento sobre o processo de invasão de *T. gondii* e os mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro terem avançado, detalhes importantes ainda não foram bem elucidados como a participação da PS no processo de desativação de macrófagos. A exposição de PS é um sinal de morte celular por apoptose diminuindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-8 e aumentando a produção de TGF- β 1 acarretando na diminuição da produção de NO (Fadok et al., 1998; 2000). Durante a evolução, *T. gondii* e outros protozoários possivelmente passaram a utilizar o mecanismo de exposição de PS para evadirem-se do sistema imune do hospedeiro (Barcinski et al., 2003; Seabra et al., 2004a; Wanderley e Barcinski, 2010). Essa estratégia pode estar relacionada à infectividade das diversas cepas de *T. gondii*, e atuando em conjunto com outros mecanismos de evasão do parasito à resposta das células hospedeiras, explicar em parte o comportamento diferenciado dessas cepas em modelo murino.

Ao avaliar a possível persistência de taquizoítos das cepas estudadas após infecção de macrófagos ativados foi observado que somente RH e, em menor grau, VEG mantiveram a sua morfologia preservada, ao passo que ME-49 e P-Br apresentaram parasitos com morfologia alterada, indicando inviabilidade. Em 2 h, todas as cepas possuem mecanismos efetivos de entrada na célula hospedeira. Entretanto esses parasitos não persistem, excetuando-se RH que mantém níveis

constantes de infecção em todo o período avaliado. O comportamento da VEG, por sua vez, apresenta altos níveis de infecção no tempo inicial e relativamente alta no tempo final quando comparado com ME-49 e P-Br e intermediário em relação ao de RH, no mesmo período. A viabilidade dos taquizoítos de RH que persistem é boa, pois a capacidade dos parasitos extraídos da cultura de macrófagos, desde 2 até 96 h, de levar camundongos a morte foi mantida. Por sua vez ME-49 e P-Br só foram capazes de encistar em camundongos quando obtidas de macrófagos recém infectados (2 h), com perda total de infectividade ao longo do período analisado, indicando que os macrófagos *in vitro* são capazes de eliminar essas cepas mais rapidamente. A cepa VEG foi capaz de encistar em camundongos quando obtida de macrófagos infectados por 2 e 24 h, demonstrando que de fato persistem de forma mais eficiente do que ME-49 e P-Br, porém bastante inferior a RH. Esses resultados parecem indicar que os parasitos entram na célula hospedeira de forma efetiva, porém somente RH e VEG, quando comparada com ME-49 e P-Br, conseguem persistir. RH possui algum mecanismo mais eficiente em burlar o sistema microbicida de macrófagos que a permite se manter na célula e se replicar, o que compensa sua taxa de entrada menor quando comparada as cepas menos virulentas. Por sua vez ME-49, P-Br e, de certa forma, VEG compensariam a ausência de sistemas eficientes de inibição do sistema microbicida do macrófago com uma maior entrada, mas são eliminados, tornando-se inviáveis ao longo do tempo.

Apesar de em variados graus, todas as cepas foram capazes de inibir a produção de NO após 24h de interação, mas, somente RH e de forma mais amena, a VEG, inibiram a produção de NO e persistiram em macrófagos após 48 h de infecção. Quando a cepa RH infecta macrófagos ativados induz a inibição na produção de NO de forma efetiva, mas é necessário que o parasito esteja vivo (Seabra et al., 2002). Esse resultado foi novamente confirmado no presente estudo no qual a cepa RH foi capaz de inibir a produção de NO, sendo essa inibição acima de 50% após 24 e 48 h de infecção. De forma diferente da RH, as cepas ME-49 e P-Br possuem metade da capacidade de inibição da produção de NO detectada após 24 h de infecção. Em 48 h ambas não conseguiram inibir a produção de NO, com a ME-49 induzindo aumento da produção desse agente microbicida. Por sua vez a cepa VEG, novamente, apresentou padrão intermediário entre a cepa RH, ME-49 e P-Br induzindo inibição em, 24 h, próxima ao apresentado por RH e mantendo

alguma inibição em 48 h, porém abaixo da induzida pela RH. Esse resultado complementa os anteriores, indicando que, devido às suas distintas capacidades de persistirem viáveis em macrófagos ativados, as cepas RH, e a VEG em menor grau, conseguem inibir a produção de NO de macrófagos ativados por mais tempo.

A produção de NO se dá através da iNOS e corroborando o resultado da inibição da produção de NO o ensaio de imunolocalização de iNOS deixou claro que a cepa RH possui capacidade de inibir a expressão dessa enzima durante o tempo avaliado. Por outro lado, ME-49 e P-Br, e em menor proporção VEG, inibiram a expressão da iNOS nos tempos iniciais, mas houve gradativo retorno da expressão dessa enzima com o passar do tempo acompanhado do retorno da produção de NO. Esses resultados ajudam a explicar a melhor eficiência na inibição da produção de NO pela cepa RH e eficiência maior da VEG em relação a ME-49 e P-Br. Portanto, a diminuição na produção de NO está diretamente ligada ao controle da expressão da iNOS que converte arginina em NO e citrulina (Moncada et al., 1991)

Os resultados aqui apresentados sugerem que a reversão da expressão de iNOS, e conseqüente inibição da produção de NO, não é somente importante no estabelecimento e sucesso do parasito de genótipo tipo I na célula hospedeira, mas também, na manutenção da infecção em tempos mais tardios. A cepa RH manteve a inibição da produção de NO nos tempos estudados, enquanto ME-49 e P-Br, em menor escala que a VEG, não mantiveram essa capacidade e ao longo do tempo apresentaram parasitos com morfologia alterada. Possivelmente a capacidade da cepa RH de infectar e se replicar em macrófagos ativados até 48 h após infecção esteja ligado a competência dessa cepa em inibir NO, como os resultados de inibição de iNOS e NO sugerem.

O envolvimento do TGF- β na reversão da expressão da iNOS e conseqüentemente da menor produção de NO foi demonstrado por nosso grupo com o uso de IgY neutralizante de TGF- β adicionada às células durante e após a infecção, revertendo a inibição da produção de NO (Seabra et al., 2004a) e confirmada pelo aumento da expressão citoplasmática de smad2 e smad3 em macrófagos infectados (Seabra et al., 2004a). Os macrófagos infectados nos tempos iniciais por todas as cepas apresentaram marcação da smad2 fosforilada no núcleo demonstrando que a inibição da produção de NO, derivada da degradação de iNOS, é regida por sinalização que envolve TGF- β . Aqui confirmamos o envolvimento do TGF- β no processo de reversão da expressão da iNOS pela marcação da smad2

fosforilada que translocou para o núcleo de macrófagos infectados. No entanto, houve uma clara diferença de marcação entre as cepas. O que chama atenção nesse resultado é que em 2 h o padrão de marcação foi bem parecido em todas as cepas avaliadas, mas somente macrófagos infectados com RH continuaram com o núcleo contendo smad2 fosforilada em tempos de infecção mais tardios, indicando uma sinalização permanente via TGF- β . Portanto, forte sinal do TGF- β só foi detectado durante todo o tempo analisado em macrófagos infectados com RH. Apesar de em VEG ter sido observada ao longo de todos os tempos, especialmente em 2 e 24 h, essa marcação não foi tão intensa quanto a apresentada pela RH com 48 h de infecção. Isso indica que os taquizoítos de RH conseguem manter esse sinal dentro do VP. Já as cepas ME-49 e P-Br só apresentaram marcação significativa com 2 h e falta de translocação para o núcleo de smad2 fosforilada em outros tempos.

A produção de TGF- β e a inibição de mecanismos microbicidas de células hospedeiras estão diretamente ligadas a exposição de PS; a relação entre inibição da produção de NO e a exposição de PS já foi observado para diversos protozoários (Barcinski et al, 2003; Seabra et al., 2004a; DaMatta et al, 2007; Wanderley e Barcinski, 2010). Em *L. amazonensis* (de Freitas Balanco et al., 2001; Barcinski et al., 2003; Wanderley et al., 2006; Wanderley et al., 2009; Wanderley e Barcinski, 2010), a forma amastigota expõe altos níveis de PS e o bloqueio desse fosfolípídeo acarreta na diminuição da invasão do parasito na célula hospedeira (Wanderley et al., 2006). Em *T. cruzi* a exposição de PS pelas formas tripomastigotas oriundas de cultivo de células, de sangue de camundongos infectado ou da metacicloênese, expõem PS e induz a translocação de smad2 fosforilado ao núcleo inibindo a expressão de iNOS através de sinalização via TGF- β . Esses eventos modulam o sistema de sinalização celular da célula hospedeira nos momentos iniciais da infecção, facilitando a sobrevivência do parasito (DaMatta et al., 2007). Em *T. gondii* (Seabra et al., 2004a) ocorre aumento da expressão de proteínas smad, sugerindo a participação do TGF- β . A translocação nuclear da smad2 fosforilada mostrada nesse trabalho é uma indicação mais contundente do envolvimento da PS na ativação do sinal de TGF- β que culmina na degradação da iNOS e inibição da produção de NO pelos macrófagos infectados, permitindo assim o sucesso do parasito. A exposição de PS é de extrema importância para que o parasito consiga invadir a célula

hospedeira, pois parasitos que não possuem essa capacidade são fagocitados por macrófagos (Dos Santos et al., 2011).

Os resultados obtidos pela citometria de fluxo dos parasitos expondo PS na membrana externa indicam que RH é a que expõe menos entre os parasitos avaliados enquanto a menos virulenta, ME-49, é a que mais expõe. Curiosamente pode-se relacionar a exposição de PS com a entrada do parasito na célula hospedeira, onde as cepas que mais expõe PS são as que possuem as maiores taxas de entrada nessa célula. Todas as cepas avaliadas expõem mais PS que a RH e são as que entraram duas vezes mais em macrófagos (2 h). Em uma análise prematura pode-se inferir que as cepas que expõe mais PS seriam aquelas que seriam mais virulentas, devido a sua alta capacidade de invadir as células hospedeiras. Esses parasitos mimetizariam uma célula apoptótica, diminuindo as taxas de produção de NO permitindo assim a sua replicação. Porém pelos dados obtidos a relação direta entre maior exposição de PS e maior virulência não é verdadeira e pode ser interpretada como um mecanismo de evasão comum a todas as cepas e de grande valia nos momentos iniciais do processo infectivo. O reconhecimento da PS pelo macrófago, a aderência, a entrada do parasito e a inibição de NO seriam de extrema importância, mas no decorrer do desenvolvimento do processo parasitário, outros mecanismos de desativação dos macrófagos devem entrar em ação e seriam esses fatores os responsáveis por grande parte da virulência de algumas cepas.

As cepas avaliadas modularam a produção de citocinas de forma diferenciada e com relação direta com a sua infectividade. RH e VEG elevaram a produção de IL-10 pelos macrófagos que inibe ativação dessas células e diminuíram a produção de IL-12 que possui papel evidente nos mecanismos microbicidas de células hospedeiras como ativação de células NK e células T secretoras as quais induzem ativação de IRGs e autofagia (Gazzinelli et al., 1993; Andrade et al., 2006; Zhao et al., 2009b). ME-49 e P-Br ativam essas citocinas de modo inverso o que ajuda a explicar a menor infectividade em relação a RH e VEG. O efetivo controle dessas citocinas é essencial para o sucesso infectivo do parasito (Gazzinelli et al., 1994).

Taquizoítos das cepas que não persistem na cultura de macrófagos ativados foram controlados através de um processo envolvendo autofagia. O marcador de vesículas autofágicas foi observado circundando os parasitos da cepa ME-49 e P-Br no tempo de 6 e 24 h; nesse último tempo a inibição na produção de NO era menor

do que nas cepas RH e VEG. Esse resultado coincide com o estudo da persistência desse parasitos que indica diminuição de células hospedeiras infectadas em 24 e 48 h. Exatamente nos tempos de 6 e 24 h após a infecção com VEG esse marcador também foi observado ao redor de alguns parasitos, resultado que explica em parte a drástica redução da persistência dessa cepa em 24 h. Possivelmente parte dos parasitos da cepa VEG conseguem evadir do sistema autofágico da célula hospedeira; no entanto com o tempo, muitos vão sendo destruídos, sobrando uma parcela pequena, mas significativa, que resiste a essa destruição e persiste em 48 h de infecção. O controle da VEG pelo macrófago provavelmente ocorre de forma mais lenta. Além de expor PS em grande porcentagem e obter sucesso no processo de invasão essa cepa persiste mais que a ME-49 e P-Br em macrófagos ativados apesar de não ser tão eficiente quanto a RH. O que parece ocorrer com a VEG é que a exposição de PS permite a sua entrada, parte dos parasitos é eliminada em tempos posteriores pela autofagia, porém os que conseguem sobreviver se replicam, mantendo a infecção. Isso fica claro quando se observa a marcação de smad2 forforilada que em 6 h e especialmente em 24 h apresenta queda acentuada, indicando que a produção de TGF- β cai e a inibição da iNOS cessa.

A autofagia é um importante mecanismo no controle de microrganismos como bactérias e protozoários (Edelson e Unanue, 2000; Zhao et al, 2007). Um dos mecanismos de ativação de macrófagos que desencadeia autofagia se dá via IFN- γ e LPS (Zhao et al, 2007), que leva a superexpressão de Atg5, indutor de formação de vacúolos autofágicos (Mizushima et al, 2002). O sistema de sinalização para gerar vesículas autofágicas é bastante complexo incluindo conjugados protéicos que convertem a LC3I solúvel em LC3II, que se liga a membrana dos autofagossomos e posteriormente se associa a outras estruturas celulares como a ubiquinina formando finalmente o fagossomo que destrói microrganismos e recicla organelas celulares (Wang et al., 2009). Autofagia atua em conjunto com outros sistemas de defesa celulares como as proteínas IRG (Mizushima et al, 2002; Kuma et al, 2007, Giménes-Xavier, 2008; Zhao et al, 2009a). Já foi observado que a eliminação de *T. gondii* de macrófagos ativados por IFN- γ e LPS está intimamente relacionada a essas proteínas (Martens et al, 2005; Ling et al, 2006; Taylor et al, 2007; Zhao et al, 2009a). Cinco horas após a infecção com *T. gondii* em macrófagos ativados já são observados VP com danos em sua membrana, que seriam causados pela Irga6, recrutada através da sinalização via atg5 (Zhao et al., 2009a). Não se conhece ao

certo como as IRGs alcançam o VP. Sabe-se porém que a associação dessas proteínas é um processo rápido que ocorre logo após a formação do VP e que é acumulativa com o tempo, além de ser hierárquica, com acúmulo de diferentes IRGs (Khaminets et al, 2010).

Outro fator importante no controle desses parasitos é o fato das IRGs atuarem em conjunto, sendo de extrema importância para definir o parasita como virulento ou não. A modulação dessa virulência se dá exatamente pela atuação coordenada das IRGs durante o processo infectivo e da capacidade do parasito de burlar esse sistema (Niedelman et al., 2012). O fato é que o mecanismo envolvendo IRGs requer muitos estudos, especialmente no que concerne à sua atuação hierárquica e ao papel que as diversas IRGs possam ter na sua totalidade e não individualmente. O que se conhece é que a virulência relacionada às cepas do tipo I se deve em parte à capacidade desses parasitos de prevenir a acumulação das proteínas IRGs no VP, enquanto as cepas do tipo II e III são susceptíveis por não conseguirem impedir a atuação das IRGs e têm seus VP destruídos (Zhao et al., 2009b).

A liberação das proteínas das róprias é importante para o sucesso da infecção causada por *T. gondii*, pois forma e mantém o VP, além de estar envolvida nos mecanismos de evasão das cepas (Howard et al., 2011). Um dos mecanismos envolvidos na manutenção do parasito em macrófagos está relacionado com a proteína da rópria denominada ROP18, presente nas cepas do tipo I e em menor concentração nas do tipo III (Steinfeldt et al., 2010). No entanto, outros tipos de proteínas das róprias parecem estar envolvidas no processo infectivo e são um produto de genes epistáticos (Zhao et al., 2009b; Fentress et al., 2010; Howard et al., 2011).

As cepas do tipo III por sua vez possuem baixa expressão de ROP18, o que de certa forma é coerente com a sua virulência mais baixa comparada com a tipo I (Saeji et al., 2005). Então como explicar a persistência intermediária entre as cepas estudadas nesse trabalho? Foi descoberta mais recentemente outra proteína da rópria (ROP5) de grande importância para a virulência de *T. gondii* (Saeji et al., 2005). A deleção do seu gene nas cepas do tipo I acarreta na diminuição acentuada da virulência (Reese e Boothroyd, 2011; Behnke et al., 2011). Foi descrito que a fosforilação das IRGs pela ROP18 é dependente da presença de ROP5. A ROP5 se liga a IRG na face externa da membrana do VP de forma dependente de GTP para que se torne ativa. A sua ativação faz com que a IRG seja exposta de forma mais

eficiente e seja fosforilada pela ROP18, inativando-a definitivamente. Cepas do tipo I possuem ROP18 e ROP5, cepas do tipo II possuem somente ROP18 e cepas do tipo III possuem pouca expressão de ROP18 e ROP5 (Saeji et al., 2005). Desse modo foi evidenciado que a modulação da virulência é influenciada pela atuação de diversas proteínas das róprias atuando de forma colaborativa. Esses achados elucidam os resultados obtidos nesse trabalho, onde a capacidade de persistência e propagação de *T. gondii* é maior nos parasitos que possuem ROP18 e ROP5. A cepa RH, tipo I, possui as duas com grande expressão, o que protege o seu VP de danos e permite que o parasito se replique e se desenvolva nos diferentes tempos observados mantendo uma constância no seu processo infectivo (Figura 8). A ME-49, cepa tipo II, possui ROP18 com baixa expressão, porém essa sozinha, sem o auxílio da ROP5, não lhe confere capacidade de impedir a ação do sistema IRG de macrófagos e tem o seu VP rompido e os parasitos expostos ao processo autofágico (Figura 9). A P-Br apresenta um padrão próximo ao da ME-49 e provavelmente não possui a ROP5 (Figura 9). A cepa tipo III VEG possui baixa expressão da ROP18 e ROP5 funcional o que eleva a virulência do parasito, mas de forma menos eficiente (Niidelman et al., 2012), o que talvez aumente a sua persistência quando comparada com a ME-49 e P-Br. Porém ela não é alta como a de RH, e isso está provavelmente ligado a baixa expressão da ROP18 que não lhe confere a mesma virulência da RH (Figura 10).

A incapacidade de algumas cepas em evadir o sistema de defesa de macrófagos, ativados por IFN- γ envolvendo as IRGs, faria com que a cepa que não possui ROP18 efetiva ou até mesmo outras proteínas das róprias importantes na manutenção do parasito na célula hospedeira, fosse destruída pelo mecanismo microbida envolvendo as IRGs, e com a destruição do parasito a expressão de iNOS voltaria, ajudando a eliminar o parasito com a produção de NO.

Os resultados apresentados sugerem que a exposição de PS possui grande importância no processo de reconhecimento e invasão da célula hospedeira além da inibição da produção de NO, principalmente nos momentos iniciais da infecção por *T. gondii*. NO seria uma molécula microbida de grande importância para o sistema de defesa dos macrófagos (Habib e Ali, 2011) e sua inibição por parasitos é de grande valia para o sucesso da infecção, especialmente no início do processo infectivo (Sacks e Sher, 2002). Posteriormente outros mecanismos possivelmente proteínas das róprias são necessários para o protozoário evadir o sistema imune do

hospedeiro e manter a infecção. A colaboração entre diversos sistemas microbicidas e a capacidade de evadir o maior número deles pode ser uma explicação para o que torna uma cepa efetiva ou não em escapar do sistema microbicida de macrófagos e elucidaria em parte o porquê da existência de virulências intermediárias apresentadas por algumas cepas. Novos estudos são necessários para se compreender não somente o modo como o parasito invade a célula hospedeira, mas também o que o mantém refratário à resposta imune do hospedeiro.

6.0. Conclusões

- As cepas RH e VEG (de forma intermediária) inibem NO e persistem em macrófagos ativados, enquanto ME-49 e PBr inibem nos tempos iniciais e não conseguem persistir em macrófagos.
- Todas as cepas expõe PS, mas de forma diferente.
- Marcação de iNOS e PS2, sugerem que a virulência de diferentes cepas de *T. gondii* pode ser correlacionada com a exposição de PS entretanto outros mecanismos são necessários para caracterizar a virulência de diferentes cepas.
- Os resultados de autofagia sugerem que existem outros mecanismos de evasão que certas cepas não conseguem evitar e são destruídas, mas todas inibem NO pela exposição de PS nos momentos iniciais da infecção

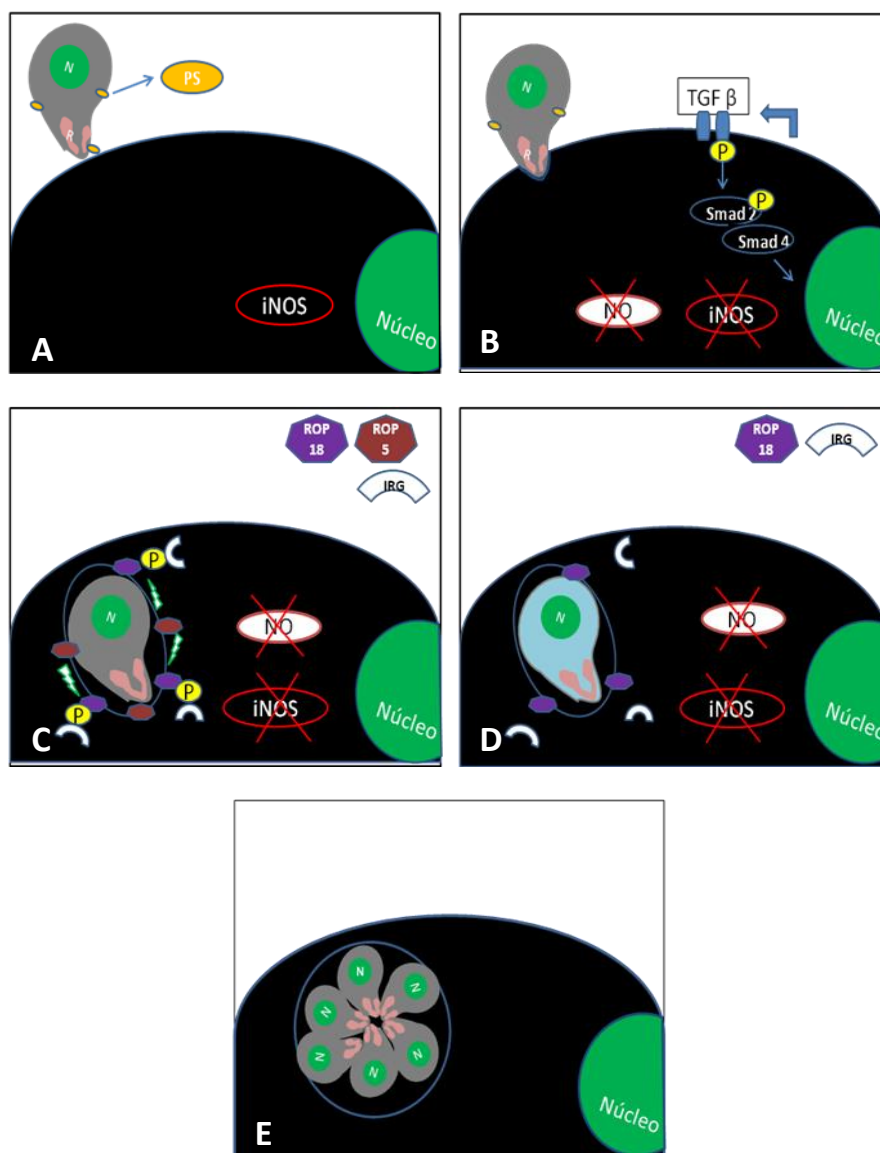


Figura 8: Hipótese da infecção causada por *Toxoplasma gondii* cepa RH em macrófagos murinos ativado. A) *T. gondii* expondo PS em sua superfície é reconhecido pelo macrófago ativado. B) A exposição de PS acarreta na sinalização através de TGF- β que atua de forma autocrina sobre o macrófago acarretando na eliminação da iNOS e NO. C) O parasito invade, então, a célula e forma seu vacúolo parasitóforo. IRGs produzidos pelo macrófago reconhecem o VP, porém são fosforiladas pelas róprias do parasito, especialmente ROP 18 e ROP 5. D) A fosforilação das IRGs pelas róprias mantém o VP íntegro e o parasito viável. E) O parasito se replica e desenvolve nas células hospedeiras.

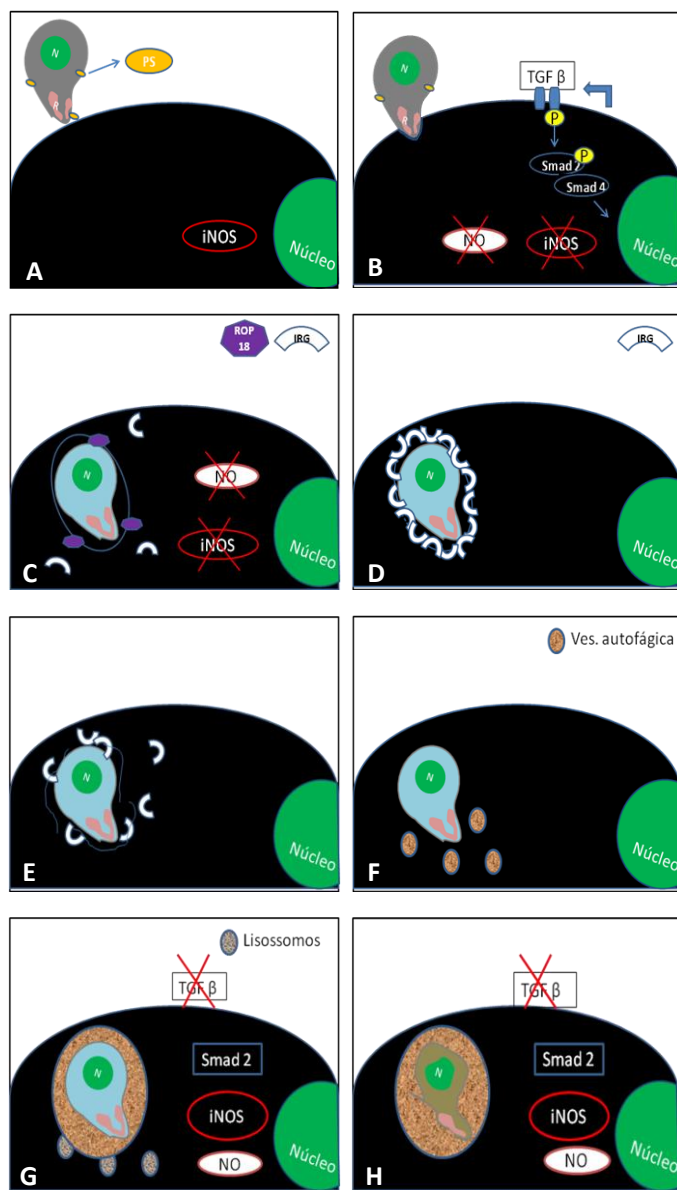


Figura 9: Hipótese da infecção causada por *Toxoplasma gondii* cepas ME-49 e PB-r em macrófagos murinos ativados. A) *T. gondii* expõe PS em sua superfície é reconhecido pelo macrófago ativado. B) A exposição de PS acarreta na sinalização através de TGF-β que atua de forma autocrina sobre o macrófago acarretando na eliminação da iNOS e NO. C) O parasito invade, então, a célula e forma seu vacúolo parasitóforo. IRGs produzidos pelo macrófago reconhecem o VP, O parasito só possui a ROP 18 de baixa funcionalidade, que não é capaz de fosforilar as IRGs D) As IRGs então, circundam o VP pressionando-o, E) As IRGs levam ao rompimento do VP expondo o parasito ao citoplasma do macrófago. F) O parasito sem a proteção do VP é reconhecido por vesículas autofágicas G) vesículas autofágicas circundam o parasito e a célula retorna ao seu estado ativado H) O parasito é finalmente destruído e o macrófago torna-se plenamente ativado.

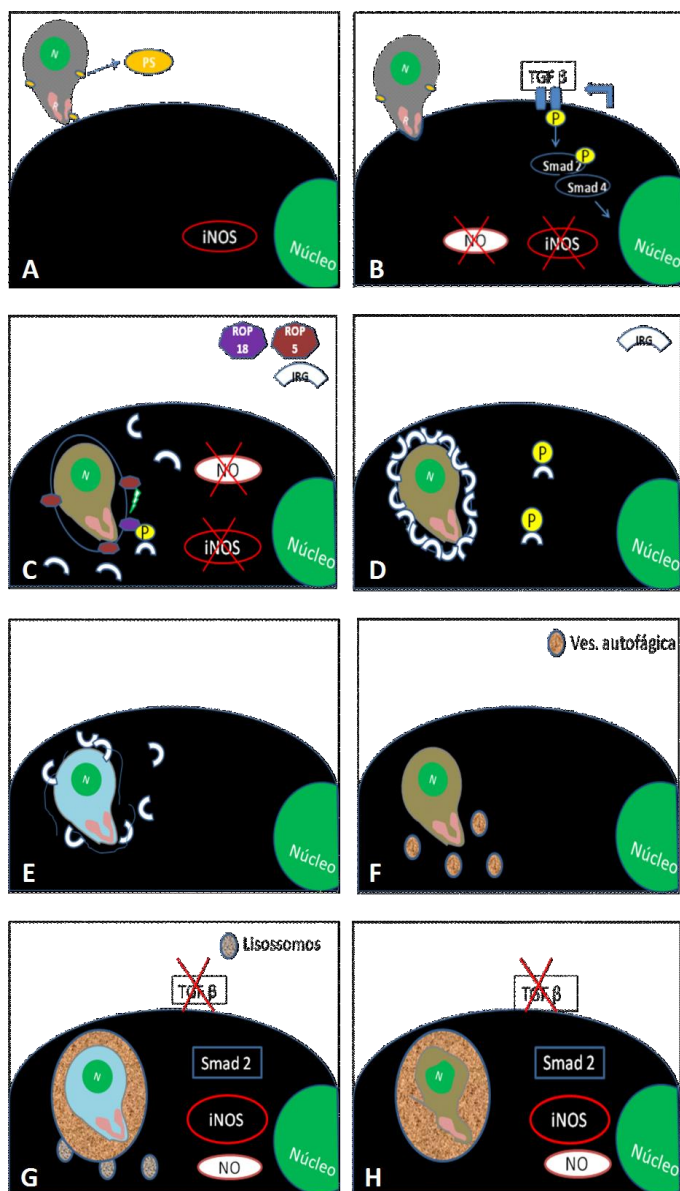


Figura 10: Hipótese da infecção causada por *Toxoplasma gondii* cepa VEG em macrófagos murinos ativados. A) *T. gondii* expõe PS em sua superfície e é reconhecido pelo macrófago ativado. B) A exposição de PS acarreta na sinalização através de TGF-β que atua de forma autocrina sobre o macrófago acarretando na eliminação da iNOS e NO. C) O parasito invade, então, a célula e forma seu vacúolo parasitóforo. IRGs produzidos pelo macrófago reconhecem o VP, O parasito só possui a ROP 18 de baixa funcionalidade e ROP5 que auxilia na fosforilação de parte das IRGs D) As IRGs então, circundam o VP pressionando-o, E) As IRGs levam ao rompimento do VP expondo o parasito ao citoplasma do macrófago. F) O parasito sem a proteção do VP é reconhecido por vesículas autofágicas. G) vesículas autofágicas circundam o parasito e a célula retorna ao seu estado ativado H) O parasito é finalmente destruído e o macrófago torna-se plenamente ativado.

7.0. Referências bibliográficas

- Adams DO (1994) Molecular biology of macrophage activation: a pathway whereby psychosocial factors can potentially affect health. *Psychosom Med* 56: 316-327.
- Adams DO, Hamilton TA (1992) Molecular basis of macrophage activation: Diversity and its origins, in: C. E. Lewis J. O'D. McGee, (Eds.), *The Macrophage*. Hillsboro, OR, USA 75–114.
- Adams LB, Hibbs JB, Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL (1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 1, 144: 2725–2729.
- Adomako-Ankomah Y, Wier, GM, Boyle JP (2012) Beyond the genome: recent advances in *Toxoplasma gondii* functional genomics. *Parasite Immunol* 34 : 80–89.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34:1185–1196.
- Aline F, Bout, D, Dimier-Poisson I (2002) Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect Immun* 70: 2368–2374.
- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste CS (2006) CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* 116: 2366-2377.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG (2003) Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 9: 55–62.
- Barcinski MA, Moreira ME, Balanco JM, Wanderley JL, Bonomo AC (2003) The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis* 2: 6–7.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YAW, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed, SG (1992) Transformation growth factor- β in *Leishmania* infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548.
- Bauer PM, Buga GM, Fukuto JM, Pegg AE, Ignarro LJ (2001) Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of enzyme. *J Biol Chem* 276: 34458-34464.
- Beckers CJ, Dubremetz JF, Mercereau-Puijalon O, Joiner KA (1994) The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127: 947–961.
- Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, Sibley D (2011) Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9631–9636.
- Bekpen CHJP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, Glowalla E, Leptin M, Howard JC (2005) The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage *Genome Biol* 6: R92.
- Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW (2000) Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci* 267: 1591–1594.
- Boothroyd JC, Dubremetz JF (2008) Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol* 6:79-88.

- Boyle JP, Radke JR (2009) A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models. *J Parasitol* 39: 903–914.
- Cabral GRA, Padrão JC, DaMatta RA (2011) Lysosomes are not involved in the degradation pathway of the inducible nitric oxide synthase of macrophages caused by *Toxoplasma gondii* infection. XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, Foz do Iguaçu, PR, Meeting book, page 33, BC23.
- Candolfi E, Hunter CA, Remington JS (1994) Mitogen and antigen specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 62: 1995-2001.
- Cheng L, Chen Y, Chen L, Shen Y, Shen J, An R, Lu, Q, Du J (2012) Interactions between the ROP18 kinase and host cell proteins that aid in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica* 122: 255– 260.
- Classen A, Lloberas J, Celada A (2009) Macrophage activation: classical versus alternative. *Met Mol Biology* 531: 29-43.
- Daley JM, Brancato SK, Thomay A.A, Reichner JS, Albina JE (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *J Leuk Biol* 87: 59-67.
- DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhães L, Goldenberg S, de Souza W (2007) *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 266: 29-33.
- DaMatta RA, Seabra SH, Manhães L, de Souza W (2000) Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages *Parasitol Res* 86: 239–243.
- Dattoli VC, Veiga RV, Cunha SS, Pontes-de-Carvalho L, Barreto ML, Alcântara-Neves NM (2011) Oocyst ingestion as an important transmission route of *Toxoplasma gondii* in Brazilian urban children. *J parasitol* 97, 6: 1080-1084.
- de Freitas Balanco, JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, Barcinski MA (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11: 1870–1873.
- Dobbelaere DA, Fernandez PC, Heussler VT (2000) *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell Microbiol* 2: 91-99.
- Dos Santos, TAT, Portes JA, Damasceno-Sá JC, Caldas LA, de Souza W (2011) Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS ONE* 6(11): e27867.
- Dubey JP, Frenkel JK (1998) Toxoplasmosis in rats: a review with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol* 77: 1–32.
- Dubey JP, Lewis B, Beam K, Abbitt B (2002) Transplacental toxoplasmosis in a reindeer (*Rangifer tarandus*) fetus. *Vet Parasitol* 110: 131-135.
- Dubey JP, Su C (2009) Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 190–195.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HF, de Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Bahia Oliveira LM, Su C (2008) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 157: 299–305.
- Edelson BT, Unanue ER (2000) Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol* 12: 425–431.
- Endo T, Pelster B, Piekarski G (1981) Infection of murine peritoneal macrophages with *Toxoplasma gondii* exposed to ultraviolet light. *Z. Parasitenkd* 65: 121–129.

- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890–898.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85–90.
- Fekadu A, Shibre T, Cleare AJ (2010) Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders--overview of evidence and mechanisms. *Folia Parasitol (Praha)* 57: 105-113.
- Feng CG, Zheng L, Lenardo MJ, Sher A (2010) Interferon-inducible immunity-related GTPase Irgm1 regulates IFN gamma dependent host defense, lymphocyte survival and autophagy. *Autophagy* 5: 232-234.
- Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekh, M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Taylor GA, Turk BE, Lichti CF, Townsend RR, Qiu W, Hui R, Beatty WL, Sibley LD (2010) Phosphorylation of immunity-related GTPases by a parasite secretory kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 8: 484-495.
- Ferguson DJ (2002) *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol* 18: 355–359.
- Flora Filho R, Zilberstein B (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil* 46: 265-71.
- França Costa J, Wanderley JLM, Costa J.ML, Barcinski MA, Barral A, Borges VM (2009) Mimetismo apoptótico como possível mecanismo imunopatogênico da leishmaniose cutânea difusa (LCD). *Gazeta Médica da Bahia* 79: 40-44.
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A (1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(13):6115-6119.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A.(1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 153(6):2533-2543.
- Giménez-Xavier P, Francisco R, Platini F, Pérez R, Ambrosio S (2008) LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int J Mol Med* 22(6):781-785.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC (2001) Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, 294: 161–165.
- Guillermo LV, DaMatta RA (2004) Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poult Sci* 83: 776–782.
- Habib S, Ali A (2011) Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem*, 26 (1): 3-17.
- Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG (1996) Contribution of nitric oxide to the host equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol* 156: 1476-1481.
- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP (2005) Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6: 41–61.

- Howard JC, Hunn JP, Steinfeldt T (2011) The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol* 14: 414–421.
- Howe DK, Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human diseases. *J Infect Dis* 172: 1561–1566.
- Jakowlew S., Mathias A, Lillehoj HS (1997) Transforming growth factor-beta isoforms in the developing chicken intestine and spleen: increase in transforming growth factor-beta 4 with coccidia infection. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 321-39.
- Joiner KA, Fuhrman S.A, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I (1990) *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249: 641–646.
- Jones TC, Hirsch JG (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 136: 1173–1194.
- Julien D, Persa F, Staquet MJ, Assossou O, Ferrandiz J, Gariazzo MJ, Peyron F, Picot S, Schmitt D, Vincent C (2004) Migration and maturation of human dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii* depend on parasite strain type. *FEMS Immunol Medical Microbiol* 42: 321-331.
- Kaufmann S, Medzhitov R, Gordon S (2004) *The Innate Immune Response to Infection*. Washington DC: ASM Press 465.
- Khaminets AHJP, Konen-Waisman SZY, Preukschat DCJ, Boyle JP, Ong YC, Boothroyd J C, Reichmann G (2010) Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* 12: 939-961.
- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH (1997) A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13955-13960.
- Kirkegaard, K., M.P. Taylor, Jackson W.T (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2:301–314.
- Kuma A, Matsui M, Mizushima N (2007) LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* 3: 323–328.
- Kuo CH, Wares JP, Kissinger JC (2008) The apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. *Mol Biol Evol* 25: 2689-2698.
- Lim DC, Cooke BM, Doerig C, Saeij JPJ (2012) *Toxoplasma* and *Plasmodium* protein kinases: Roles in invasion and host cell remodelling. *Int J for Parasitol* 42: 21–32.
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, Yap GS (2006) Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med* 203 (9): 2063-2071.
- Lüder CG, Aligner M, Lang C, Bleicher N, Gross U (2003) Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int J Parasitol* 33: 833–844.
- Lüder CG, Stanway RR, Chaussepied M, Langsley G, Heussler VT (2009) Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. *Int J Parasitol* 39: 163–173.

- Lycke E, Carlberg K, Norrby R (1975) Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infect Immun* 11, 4: 853-861.
- Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, et al. (2005) Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *Plos Pathog* 1: e24.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27: 451-83.
- Ming M, Ewen ME, Pereira M (1995) Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*, 82: 287-296.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27: 421–429.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.*43:109–142.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci*, 108, 2457–2464.
- Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM T, Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO (2006) Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *J Infect Diseases* 12: n°2. 326-329.
- Niedelman W, Gold DA, Rosowski EE, Sprockholt JK, Lim D, et al. (2012) The rhopty proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. *PLoS Pathog* 8(6): e1002784.
- Norrby R (1970a) Host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2, 3: 250-255.
- Norrby R (1970b) Immunological study on the host cell penetration factor of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 3, 2: 278-286.
- Norrby R, Lycke E (1967) Factors enhancing the host-cell penetration of *Toxoplasma gondii*, *J Bacteriol* 1: 53-58.
- Padrão JC, Kanashiro MK, Seabra SH, da Silva MSF, DaMatta RA (2009) Inducible nitric oxide synthase degradation pathway in activated macrophages after *Toxoplasma gondii* infection. XIII International Congress of Protozoology, XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, Armação de Búzios, RJ, Meeting book, page 112, BC82.
- Pearson education (2004) By Robert W. Bauman Publisher: Benjamin Cummings ISBN-13: 978-0-321-66766-3.
- Pinhal-Enfield, G, Leibovich SJ (2011) Macrophage heterogeneity and wound Healing. *Adv Wound Care* 2: 89-95.
- Pinhal-Enfield, G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzma, AL, Boons GJ, Leibovich S J (2003) An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol* 163: 711–721.
- Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G (2005) Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 142: 481-489.
- Ramanathan M, Pinhal-Enfield G, Hao I, Leibovich SJ (2007) Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (vegf) expression in macrophages by adenosine a2a receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the vegf promoter. *Mol Biol Cell* 18: 14–23.

- Reese ML, Boothroyd JC (2011) A conserved non-canonical motif in the pseudoactive site of the ROP5 pseudokinase domain mediates its effect on *Toxoplasma* virulence. *J Biol Chem* 286: 29366–29375.
- Sacks, D., Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*, 3, 1041-1047.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC (2005) Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21: 476–481.
- Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A (1997) Inducible nitric oxide synthase is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 185: 1261-1273.
- Schlüter D, Deckert-Schlüter M, Lorenz E, Meyer T, Röllinghoff M, Bogdan C (1999) Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii* susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. *J. Immunol* 162: 3512-3518.
- Schwartzman JD (1986) Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect Immun.* 51, 3: 760-764.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA (2004a) *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 744–752.
- Seabra SH, DaMatta RA, de Mello FG, de Souza W (2004b) Endogenous polyamine levels in macrophage is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 90: 455-460
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. (2002) *Toxoplasma gondii* inhibits nitric oxide production by activated mouse macrophages. *Exp Parasitol* 100: 62-70.
- Sibley LD, Boothroyd JC. (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359(6390):82-85.
- Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315: 416- 419.
- Sinai AP, Joiner KA (2001) The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Biol* 154: 95–108.
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA (1997) Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 110: 2117–2128.
- Steinfeldt TK, Sen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, Sibley LD, Hunn, JP, Howard JC (2010) Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol.* 8: e1000576.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7773-7777.
- Stuehr DJ, Marletta MA (1987) Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon γ . *J Immunol* 139: 518-525.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley, LD (2003) Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299: 414–416.

- Su C, Khan A, Peng Z, Debashree M, Ajzenberg D, Dardéd ML, Zhuf XQ, James W, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: n° 15.
- Taylor GA, Feng CG, Sher A (2007) Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes Infect* 9: 1644–1651.
- Toxoplasmosis. *Toxoplasma* infection. Last Updated: May 1, 2005. Institute for International Cooperation in Animal Biologics An OIE Collaborating Center Iowa State University College of Veterinary Medicine/ Center for Food Security and Public Health College of Veterinary Medicine Iowa State University Ames, Iowa 50011 Phone: (515) 294 7189 FAX: (515) 294–8259 E-mail: cfsph@iastate.edu Web: <http://www.cfsph.iastate.edu>
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C (1988) Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334: 260-262.
- van Furth R (1975) Modulation of monocyte production in: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology (R. van Furth, ed) pp. 161-172, Blackwell.
- Van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Müller A, Hölscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T (2006) Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci USA* 37 : 13837-13842.
- Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD (2003) Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19: 9–12.
- Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, Ermentrout GB, Chow CC, Bahar I, Billiar TR (2004) Cross-talk between nitric oxide and transforming growth factor-beta1 in malaria. *Curr Mol Med* 4: 787-797.
- Vyas A, Kim SK, Sapolsky RM (2007) The effects of *Toxoplasma* infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neuroscience* 24: 342-348.
- Wanderley JL, Barcinski MA (2010) Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci* 67: 1653–1659.
- Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA (2006) Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 176: 1834–1839.
- Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA (2009) Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS One* 4: e5733.
- Wang H, Wang TL, Qingli H, Xingxing H, Wang L, Tingting L, Xiucui X, Wang Y, Fangli L, Zhaorong L, Yu L, Shen J (2012) Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in eastern China. *J Food Microbiol*, doi, 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.011.
- Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A (2009) Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *J Biol Chem* 16;284(3):1694-701. doi: 10.1074/jbc.M807890200.
- Werk R (1985) How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis* 7: 449-457.
- Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS (2007) Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. *Infect Immun* 75: 4799–4803.

- Zhao YO, Khaminets A, Hunn JP, Howard JC (2009a) Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. PLoS Pathog 5(2):e1000288
- Zhao Y, Ferguson DJ, Wilson DC, Howard JC, Sibley LD, Yap GS (2009b) Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTP as mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. J Immunol 182: 3775–3781.