

ANÁLISE DA INFECÇÃO *in vitro* E *in vivo* POR
SUBPOPULAÇÕES DE *Toxoplasma gondii* QUE EXPÕEM
OU NÃO FOSFATIDILSERINA

THIAGO ALVES TEIXEIRA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2013

ANÁLISE DA INFECÇÃO *in vitro* E *in vivo* POR SUBPOPULAÇÕES DE
Toxoplasma gondii QUE EXPÕEM OU NÃO FOSFATIDILSERINA

THIAGO ALVES TEIXEIRA DOS SANTOS

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

ORIENTADOR: SERGIO HENRIQUE SEABRA

COORIENTADOR: RENATO AUGUSTO DAMATTA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2013

ANÁLISE DA INFECÇÃO *in vitro* E *in vivo* POR SUBPOPULAÇÕES DE
Toxoplasma gondii QUE EXPÕEM OU NÃO FOSFATIDILSERINA

THIAGO ALVES TEIXEIRA DOS SANTOS

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

Aprovada em 02 de abril de 2013.

Comissão examinadora:

Prof^a. Rossiane Claudia Vomaro (Doutora em Ciências) – UFRJ

Prof. Thiago Motta Venâncio (Doutor em Ciências) – UENF

Prof. Fernando Costa e Silva Filho (Doutor em Ciências) – UENF

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

Prof. Sergio Henrique Seabra (Doutor em Ciências) – UEZO/UENF (Orientador)

“Pra quem tem pensamento forte, o impossível é só questão de opinião.”

Alexandre Magno Abrão

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande irmão e orientador Sergio Henrique Seabra por todo conhecimento, energia e oportunidades concedidas;

Ao meu coorientador e grande amigo Renato Augusto DaMatta pelo apoio, sabedoria e atenção cedidos;

A minha irmã científica, Juliana de Araújo Portes, pelo companheirismo por toda esta jornada;

Aos Professores Lúcio Caldas, Anderson Franzen, Daniel Escorsim, Jamila Perini, Francisco de Souza e Fábio Fortes por todo conhecimento repassado;

Ao Professor Clóvis de Paula Santos por toda atenção e revisão desta dissertação;

Aos amigos da UEZO Francisco, Adriano, Nayara, Ezaine, Loyze, Patrícia, Thayane, Eliandro, Verônica, Pedro, Tatiana, Amanda, João, Taís, Karina, Amada e outros tantos pela agradável convivência e por tornarem meu dia a dia mais leve;

Aos amigos da UENF Farlen, Gabriel, Fernanda, Luciana, Laura, Thiago e outros por toda hospitalidade e ajuda;

Aos amigos Juliana Azevedo e João Cláudio pela disponibilidade, ajuda, paciência e alegria;

Aos meus pais e irmão por todo carinho, amor e ensinamentos cedidos a mim;

Aos meus queridos padrinhos por todo amor, apoio e estímulo;

Enfim, a todos que colaboraram para a minha formação pessoal e científica.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP : Adenosina Trifosfato
- ATPase : Enzima Adenosina Trifosfato
- DMEM : Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
- GTPase : Enzima Guanosina Trifosfato
- IFN- γ : Interferon gamma
- IL : Interleucina
- LPS : Lipopolissacarídeo
- μg : Microgramas
- μm : Micrômetros
- μl : Microlitros
- M : Molar
- NO : Óxido nítrico
- iNOS : Óxido nítrico sintase induzida
- PBS : Solução salina tamponada de fosfato
- PS : Fosfatidilserina
- PS+ : Fosfatidilserina positivo
- PS- : Fosfatidilserina negativo
- TGF- β 1: Fator de Crescimento Transformante-beta1
- TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

A exposição de fosfatidilserina (PS) por células indica o tipo de morte celular conhecida como apoptose, mas também tem sido relacionada a mecanismos de evasão de parasitos, conceito conhecido como “mimetismo apoptótico”. *Toxoplasma gondii* mimetiza células apoptóticas por expor PS, induzindo a secreção de fator de crescimento transformante-beta1 por macrófagos ativado infectado, levando à degradação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), inibição da produção de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, a persistência do parasito nessas células. Neste trabalho, a subpopulação de *T. gondii* que expõe PS foi separada da subpopulação que não expõe esse fosfolípido. Interações realizadas entre as subpopulações isoladas de *T. gondii* e células hospedeiras demonstraram que a subpopulação PS+ foi capaz de invadir ativamente estas células e inibir a produção de NO por macrófagos peritoneais murinos ativado, enquanto a subpopulação PS- não inibe a produção de NO e depende de mecanismo endocítico para entrar nas células hospedeiras. Camundongos infectado com as subpopulações isoladas de *T. gondii* fenecem precocemente, quando comparado a camundongos infectado com a população total de parasitos. Baço e fígado de camundongos infectado com parasitos PS- apresentaram poucos parasitos e extenso infiltrado inflamatório. Em contraste, a infecção com a subpopulação PS+ induziu maior carga parasitária e nenhum infiltrado inflamatório. Já a infecção com a população total, gerou equilíbrio entre carga parasitária e inflamação. Assim, elucidamos a causa da morte precoce dos camundongos infectado com as subpopulações isoladas. Estes resultados sugerem que as subpopulações possuem diferentes mecanismos de invasão e ambas são essenciais para o sucesso da infecção e conseqüente sobrevivência do parasito e do hospedeiro.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Fosfatidilserina; Macrófago; Inflamação; Mimetismo apoptótico.

ABSTRACT

The exposure of phosphatidylserine (PS) by cells indicates a type of cell death known as apoptosis, but has also been linked to parasite evasion mechanisms, a concept known as "apoptotic mimicry". *Toxoplasma gondii* mimics apoptotic cells by exposing PS, inducing the secretion of transforming growth factor- β 1 by infected macrophages, leading to degradation of the enzyme inducible nitric oxide synthase, inhibition of nitric oxide (NO) production and the consequent persistence of the parasite in these cells. In this work, the subpopulation of *T. gondii* that exposes PS(+) was separated from the subpopulation that does not expose (PS-) this phospholipid. Interactions performed between subpopulations isolated from *T. gondii* and host cell showed that PS+ subpopulation was able to invade these cells and actively inhibited NO production by activated murine peritoneal macrophages, whereas PS- subpopulation did not inhibit NO production and was dependent of an endocytic mechanism to invade host cells. Mice infected with the isolated subpopulations of *T. gondii* died early, when compared to mice infected with the total population of parasites. Spleen and liver of mice infected with PS- parasites showed few parasites and extensive inflammatory infiltrate. In contrast, infection with the PS+ subpopulation induced higher parasite load and no inflammatory infiltrate. The infection with the total population induced a balance between parasite load and inflammation. Thus, clarifying the cause of early death of mice infected with the isolated subpopulations. These results suggest that subpopulations have different mechanisms of invasion and both are essential for successful infection and subsequent survival of the parasite and host.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Phosphatidylserine; Macrophage; Inflammation; Apoptotic mimicry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Esquema 1: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Esquema 2: Fases do ciclo celular de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Esquema 3: Mecanismos de invasão do <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Esquema 4: Duas formas de ativação de macrófagos	12
Esquema 5: Reconhecimento e processamento de células apoptóticas por macrófagos.....	14
Esquema 6: Enzimas capazes de translocar fosfatidilserina em membranas biológicas.....	16
Figura 1. Subpopulações fosfatidilserina (PS)+ e PS- de <i>Toxoplasma gondii</i> foram magneticamente separadas e analisadas por citometria de fluxo após marcação com annexina-V.....	21
Figura 2. Interação da população total e subpopulações PS+ ou PS- de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> com macrófagos murinos.....	23
Figura 3: Microscopia óptica e eletrônica de varredura de vacúolos de macrófagos após interação com subpopulação PS- de <i>T. gondii</i>	25
Figura 4: Microscopia óptica e eletrônica de varredura vacúolos de macrófagos após interação com subpopulação PS+ de <i>T. gondii</i>	26
Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão das subpopulações isoladas de <i>Toxoplasma gondii</i> após interação com macrófagos.....	27
Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão das subpopulações isoladas de <i>Toxoplasma gondii</i> após interação com linhagem de células não-fagocíticas LLC-MK2.....	28
Figura 7: Curva de sobrevivência de camundongos após a infecção com <i>Toxoplasma gondii</i>	30
Figura 8: Análise patológica de baço e fígado de camundongos C57/BL6 após interação com a subpopulação PS- de <i>Toxoplasma gondii</i>	31
Figura 9: Análise patológica de baço e fígado de camundongos C57/BL6 após interação com a subpopulação PS+ de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Figura 10: Análise patológica de baço e fígado de camundongos C57/BL6 após interação com a população total de <i>Toxoplasma gondii</i>	33
Tabela 1. Número médio de macrófagos, linfócitos e taquizoítos por campo microscópico no baço e no fígado de camundongos infectados com a população total de <i>Toxoplasma gondii</i> e as subpopulação PS+ ou PS-.....	34

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Toxoplasmose.....	3
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	4
2.2.1. Taxonomia	4
2.2.2. Distribuição mundial	4
2.2.3. Ciclo vital	4
2.2.4. Divisão por endodiogenia	6
2.2.5. Mecanismos de invasão	7
2.3. O macrófago	10
2.3.1. Funções: Ativação Clássica X Ativação Alternativa	11
2.3.2. Mecanismos de destruição de patógenos: resposta imune inata contra <i>Toxoplasma gondii</i>	12
2.3.3. Processamento de células apoptóticas	13
2.4. Interação parasito célula hospedeira	14
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivo Geral:	17
3.2. Objetivos Específicos:	17
4. Materiais e Métodos	18
4.1. Macrófagos peritoneais e LLC-MK2.....	18
4.2. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	18
4.3. Isolamento das subpopulações PS+ e PS- e análise da eficiência do mecanismo de separação por citometria de fluxo	18
4.4. Ativação de macrófagos peritoneais e interação com parasitos	19
4.5. Preparo de amostras para análise morfológica e determinação do índice de infecção	19
4.6. Análise da produção de óxido nítrico	20

4.7. Teste <i>in vivo</i>	20
4.8. Microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.....	20
5. Resultados.....	21
5.1 – Avaliação do grau de pureza das subpopulações de parasitos isolados.....	21
5.2 – Análise do mecanismo de invasão das subpopulações de <i>T. gondii</i> e capacidade de inibir a produção de NO em células hospedeiras.	22
5.3 - Avaliação por microscopia do mecanismo de entrada das subpopulações de <i>T. gondii</i> em células hospedeiras.....	24
5.4 – Análise <i>in vivo</i> da infecção originada pelas subpopulações isoladas de <i>T. gondii</i>	29
6. Discussão.....	35
7. Conclusão.....	38
8. Referências Bibliográficas	39
9. Anexo – Artigo Publicado	48

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório (Tender *et al.*, 2000). Este parasito possui distribuição mundial, ampla gama de hospedeiros, e é considerado um dos mais bem sucedidos na terra (Tender *et al.*, 2000; Carruters, 2002). Cerca de um terço da população humana é soropositiva para *T. gondii* (Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto, a maioria das infecções é assintomática, mas manifestações clínicas graves podem surgir em indivíduos imunocomprometidos (Tender *et al.*, 2000). A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados controla a proliferação de *T. gondii* (Adams *et al.*, 1990; Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004). No entanto, como mecanismo de sobrevivência, o parasito regula a produção de NO e persiste em macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002; Lüder *et al.*, 2003; Seabra *et al.*, 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Rozenfeld *et al.*, 2005). Nosso grupo tem demonstrado que aproximadamente 50% da população total de *T. gondii*, cepa RH, expõe fosfatidilserina (PS) no lado extracelular de sua membrana plasmática. Este mecanismo está envolvido na inibição de produção do NO durante a infecção em macrófagos ativados, garantindo, assim, a persistência do parasito (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Lüder *et al.*, 2003; Rozenfeld *et al.*, 2005).

A redução da expressão da enzima NO sintase induzível (iNOS) (Seabra *et al.*, 2002, 2004; Lüder *et al.*, 2003; Guillermo e DaMatta, 2004) e o desaparecimento do fator nuclear kappa B do núcleo de macrófagos ativados infectados com *T. gondii* ocorre de forma dependente da produção do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) (Seabra *et al.*, 2004). PS é um fosfolípido presente na membrana plasmática, estando principalmente envolvido na sinalização para a captação de células apoptóticas (Fadok *et al.*, 2001; Clark, 2011). A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos induz uma resposta antiinflamatória baseada na exposição de PS (Fadok *et al.*, 1998; Frey e Gaipl, 2011) que conduz à secreção de TGF- β 1 (Fadok *et al.*, 1998; Huynh *et al.*, 2002; Frey e Gaipl, 2011). Devido a esta propriedade e presença em protozoários, PS tem sido relacionada ao mecanismo de evasão da *Leishmania amazonensis* em macrófagos, um conceito conhecido como "mimetismo apoptótico" (Barcinski *et al.*, 2003; Wanderley *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a exposição de PS por este protozoário está envolvida no processo de internalização, causando ativação alternativa de macrófagos através da

indução de TGF- β 1, da interleucina (IL) -10, e inibição da produção de NO (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006). Da mesma forma, tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* expõem PS, reduzindo a expressão da iNOS após a infecção de macrófagos ativados (DaMatta *et al.*, 2007). Mimetismo apoptótico também tem sido demonstrado na infecção do vírus *vaccinia* em células hospedeiras (Mercer *et al.*, 2008). O mecanismo de invasão de *T. gondii* envolve a formação de uma junção móvel entre o parasito e a membrana plasmática da célula hospedeira. A membrana plasmática invagina concomitantemente com a formação do vacúolo parasitóforo. Este processo é conhecido como a invasão ativa (Morisaki *et al.*, 1995). No entanto, a entrada de taquizoítas também pode ocorrer por uma via de internalização que envolve a célula hospedeira (Jones *et al.*, 1972; Morisaki *et al.*, 1995), como foi recentemente demonstrado em estudo utilizando Dynasore (Caldas *et al.*, 2009), um inibidor da via endocítica (Kirchhausen *et al.*, 2008).

Neste trabalho, demonstramos os mecanismos imunopatológicos da interação entre as subpopulações isoladas PS+ e PS- de *T. gondii* e células hospedeiras. Análises morfológicas de interações na presença de Dynasore (inibidor de via endocítica) mostraram que os parasitos PS+ invadiram macrófagos por penetração ativa, enquanto parasitos PS- foram internalizados por mecanismo endocítico. Apenas a subpopulação PS+ de *T. gondii* foi capaz de inibir a produção de NO por macrófagos ativados. Em ensaio utilizando linhagem celular não-fagocítica, somente parasitos PS+ foram capazes de invadir estas células. Além disso, camundongos infectados com as subpopulações isoladas morreram precocemente, quando comparados aos camundongos infectados com a população total de parasitos. Grande infiltrado inflamatório foi encontrado em camundongos infectados com a subpopulação PS-, e uma maior carga parasitária estava presente em camundongos infectados com a subpopulação PS+, elucidando a causa da morte precoce dos camundongos infectados com subpopulações isoladas. Coletivamente, estes resultados indicam que o mecanismo de escape de *T. gondii* é dependente da exposição de PS e que ambas as subpopulações do parasito são necessárias para uma infecção bem sucedida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose, zoonose causada pelo parasito *T. gondii*, possui distribuição mundial (Tenter *et al.*, 2000). Um terço da população mundial é soropositiva para *T. gondii* (Montoya e Liesenfeld, 2004). No Brasil, a soroprevalência varia entre 50 e 80% da população (revisto em Cantos *et al.*, 2000). No entanto, a doença só desenvolve para a fase grave em indivíduos imunocomprometidos, tornando a maioria das infecções primárias pelo parasito assintomáticas (Wong e Remington, 1994).

A infecção primária por *T. gondii* durante o período gestacional pode originar a toxoplasmose congênita, visto que o parasito é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto (Weiss e Kim, 2007). Este parasito pode se multiplicar na maioria das células nucleadas e possui tropismo pelos tecidos dos olhos e do sistema nervoso central (Ferguson, 2009). A toxoplasmose pode ser contraída, ainda, através da ingestão de água (Bahia Oliveira *et al.*, 2003), leite *in natura* (Dressen 1990; Dubey, 1993) e alimentos crus ou mal cozidos contaminados por *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Esta forma de infecção é denominada toxoplasmose adquirida.

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por *T. gondii* ocorre de forma assintomática, onde hospedeiro desenvolve uma resposta imunológica contra o parasito. Esta resposta pode inibir a evolução da infecção para a doença (fase crônica), mas não é capaz de eliminar o parasito. Em casos de imunodepressão, o parasito volta a desenvolver-se normalmente, desencadeando a forma grave da toxoplasmose (fase aguda), podendo causar lesões no sistema nervoso central, retinocoroidites e encefalites (Ambroise-Thomas e Pelloux, 1993; Ferreira e Borges, 2002).

O tratamento de pacientes com toxoplasmose na fase aguda é realizado, na maioria dos casos, através da administração de fármacos antifolato, onde o mais comum é a associação entre sulfadiazina e pirimetamida. No entanto, o emprego desses fármacos está relacionada com efeitos colaterais, como a supressão medular. Desta forma, é importante a uso concomitante de ácido fólico, a fim de reduzir efeitos hematológicos indesejados durante o tratamento (Frenkel & Hitchings,

1957; Frenkel *et al.*, 1960; Haverkos, 1987). O tratamento de gestantes é baseado no emprego de espiramicina, um antibiótico ativo contra a forma taquizoíta do parasito (Garin & Eyles, 1958; Niel *et al.*, 1981). Em pacientes alérgicos a sulfa, o tratamento é realizado com a administração de clindamicina, um antibiótico, associado à pirimetamina (Dannemann *et al.*, 1992; Katlama *et al.*, 1996; Montoya & Liensfeld, 2004).

2.2. *Toxoplasma gondii*

2.2.1. Taxonomia

Esse parasito pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe *Sporozoa*, Subclasse *Coccidia*, Ordem *Eucoccidiida*, Família *Sarcocystidae* e Subfamília *Toxoplasmatinae* (Montoya & Liensfeld, 2004).

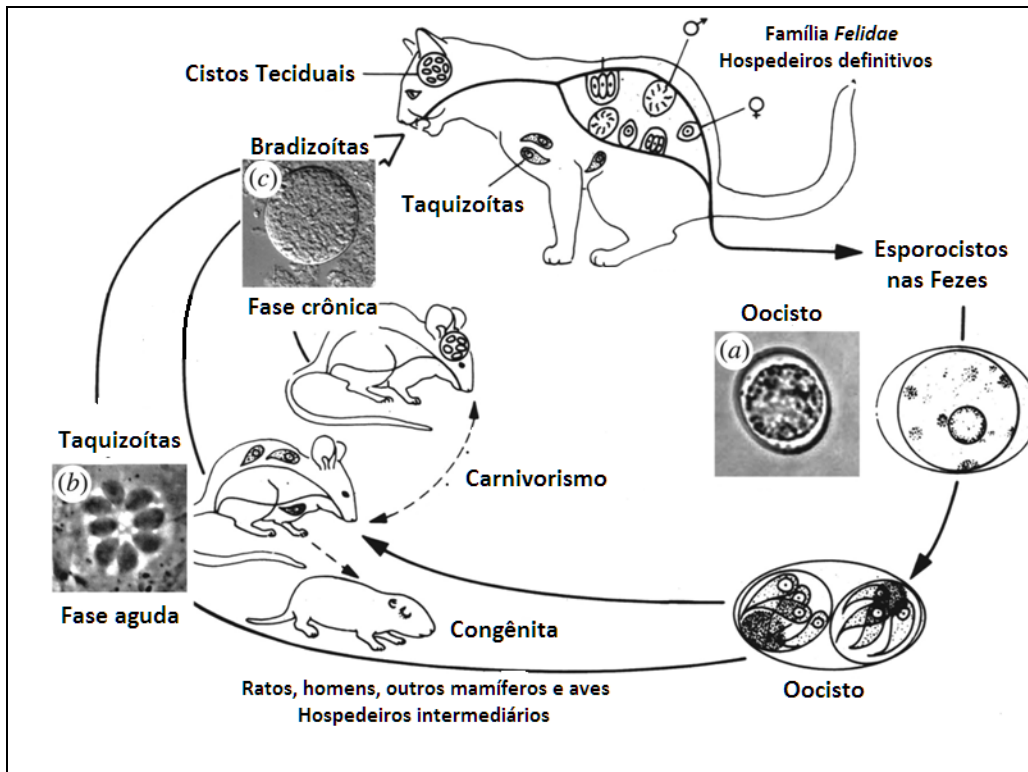
2.2.2. Distribuição mundial

Toxoplasma gondii foi descrito primeiramente no Brasil por Splendore (1908) em coelho e por Nicolle e Manceaux (1908) no Norte da África em um roedor (*Ctenodactylus gundi*). Trata-se de um protozoário parasítico intracelular obrigatório de distribuição mundial, considerado um dos mais bem sucedidos do planeta, sendo capaz de infectar grande variedade de vertebrados homeotérmicos, incluindo seres humanos e animais de importância econômica (Lyons e Johnson, 1995; Tenter *et al.*, 2000; Carruthers *et al.*, 2002; Sibley *et al.*, 2010).

2.2.3. Ciclo vital

Toxoplasma gondii tem como hospedeiros definitivos membros da família *felidae* e como hospedeiros intermediários outros animais endotérmicos durante seu ciclo de vida (Esquema 1). As principais formas infectivas do parasito são os bradizoítos, que formam cistos teciduais, e os esporozoítos, que formam oocistos. A infecção origina-se principalmente por via oral, através da ingestão de água e vegetais contendo oocistos ou carne mal cozida contaminada por cistos teciduais (Wong e Remington, 1993). Após a ingestão, ocorre o rompimento da parede externa dos cistos teciduais e dos oocistos, liberando, assim, as formas infectantes

bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente, no intestino do hospedeiro. Os parasitos liberados infectam enterócitos e se diferenciam em uma forma de multiplicação rápida, o taquizoíto, que se multiplica assexuadamente por endodiogenia (Frenkel, 1973; Blader e Saeij, 2009; Sibley *et al.*, 2010). Os taquizoítos são liberados na corrente sanguínea após o rompimento da membrana da célula hospedeira, ou são carregados por células CD11b ou CD11c positivas (Courret *et al.*, 2006) possibilitando, assim, disseminação do parasito para outros tecidos. Esta infecção inicial caracteriza a fase aguda da doença. Quando o sistema imunológico do hospedeiro começa a atuar sobre os taquizoítas, o parasito sofre nova diferenciação em bradizoíto, que é uma forma de desenvolvimento lenta, formando cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da infecção (Frenkel, 1973; Blader e Saeij, 2009; Sibley *et al.*, 2010). Em membros da família *Felidae*, após a ingestão de alimentos contendo cistos teciduais ou oocistos, os bradizoítos ou esporozoitos liberados no intestino infectam os enterócitos, multiplicam-se por uma série de esquizogonias e diferenciam-se em gametas masculinos e femininos. A fusão desses gametas resulta na formação de um zigoto diplóide (oocisto) não esporulado. O oocisto é liberado no ambiente através das fezes do animal, esporula formando dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. Portanto, cada oocisto origina oito progênies haploides, os esporozoítos (Wong e Remington, 1993; Sibley *et al.*, 2010). *Toxoplasma gondii* também pode ser transmitido pela via transplacentária ao feto durante a infecção aguda de fêmeas no período de gestação (Dubey 1977; Weiss e Kim, 2007; Blader e Saeij, 2009) (Esquema 1).

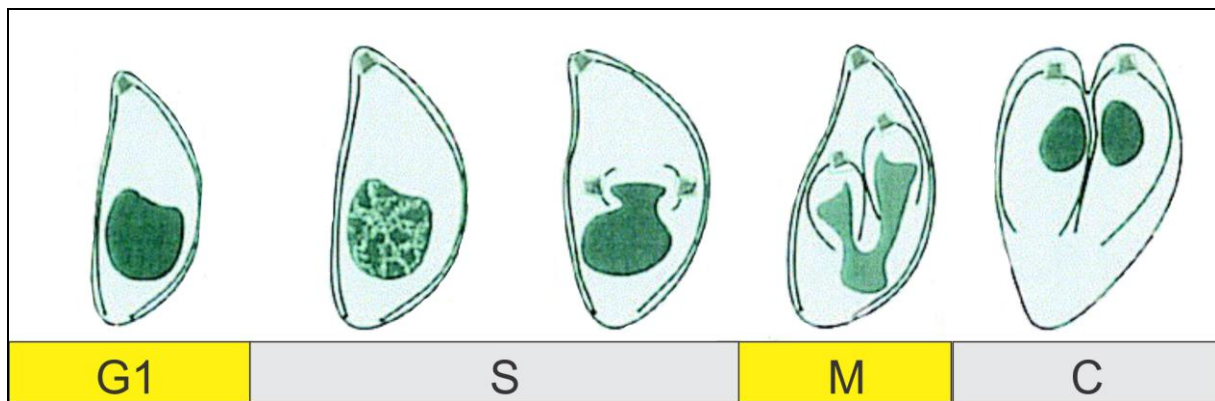


Esquema 1: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Replicação sexuada ocorre apenas no intestino dos membros da família *felidae* (hospedeiros definitivos), resultando na excreção de (a) oocistos diplóides que esporulam no ambiente, originando esporozoítos. Oocistos são resistentes no ambiente e infectam hospedeiros através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Durante a fase aguda da infecção, (b) taquizoítos dividem-se rapidamente, por endodiogenia e podem ser transmitidos congênitamente. Na fase crônica, (c) cistos contendo bradizoítos (forma de replicação lenta) são formados em tecidos do hospedeiro. Estes cistos teciduais são disseminados por diversos hospedeiros por via oral (Adaptado de Sibley *et al.*, 2010).

2.2.4. Divisão por endodiogenia

A replicação por endodiogenia consiste na forma de reprodução assexuada na qual duas células-filhas são formadas no interior da célula-mãe que lisa ao final do processo liberando as células-filhas. Esta forma de divisão ocorre durante a formação de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii*. O ciclo celular do parasito durante a endodiogenia é relativamente simples (Esquema 2), possuindo apenas quatro fases facilmente detectadas por marcadores específicos: G1, S, M e C. O início da fase G1 é marcado pela replicação do complexo de Golgi, seguido da

translocação do centrosomo da parte anterior para a posterior do núcleo. A fase S é iniciada com a duplicação do centrosomo, coincidindo com o início da duplicação do material genético. Na fase M ocorre a formação de dois novos complexos apicais rudimentares, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo interno de membrana, definindo, assim, as células-filhas dentro da célula-mãe. Progressivamente, na fase C, o núcleo termina o processo de replicação e as células-filhas estendem-se, consumindo toda a célula-mãe, dando origem a dois novos parasitos (Gaji *et al.*, 2010).



Esquema 2: Fases do ciclo celular de taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. Fase G1: início do processo de replicação. Fase S: duplicação do material genético e do centrosomo. Fase M: formação de complexos apicais rudimentares. Fase C: citocinese (Adaptado de Radke *et al.*, 2001).

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

2.2.5. Mecanismos de invasão

Toxoplasma gondii possui duas formas distintas de invadir células, as quais resultam em respostas imunológicas diferenciadas do hospedeiro. São elas penetração ativa e fagocitose. Na penetração ativa em células hospedeiras (Esquema 3, lado esquerdo), a invasão é gerida pelo próprio parasito (Morisaki *et*

al., 1995). Organelas secretórias presentes em *T. gondii*, como róprias, micronemas e grânulos densos são fundamentais para que esta invasão ocorra (Dubremetz *et al.*, 1993; Carruthers & Sibley, 1997). O processo inicia-se com a adesão de *T. gondii* à membrana da célula alvo, momento no qual ocorre a secreção de MICs, proteínas provenientes do micronema que se ligam à célula hospedeira (Dubremetz *et al.*, 1998; Brossier *et al.*, 2003). A polimerização de filamentos de actina na parte apical do parasito é responsável pela translocação de adesinas, como a MIC2, ligadas a célula hospedeira. Esta polimerização serve como substrato para a ligação de moléculas de miosina conectadas ao complexo interno de membrana do parasito (Sibley, 2003). A motilidade de *T. gondii* durante a invasão ocorre através da aldolase, enzima ligada a via glicolítica, que dispara a polimerização local da actina e atua na ligação entre a MIC2 e o citoesqueleto do parasito, gerando, assim, a mobilidade necessária para que o parasito invada a célula hospedeira (Sibley, 2003).

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

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

A membrana do vacúolo parasitóforo é formada por componentes oriundos tanto do parasito quanto da célula hospedeira. Esta membrana possui a capacidade de selecionar a passagem de nutrientes da célula hospedeira para o interior do vacúolo, funcionando como uma “peneira molecular”, permitindo, assim, a nutrição do parasito durante seu desenvolvimento. Isto se dá através de poros localizados na membrana do vacúolo, que permitem a passagem de solutos de baixo peso molecular. Esses poros são oriundos da associação de proteínas presentes no vacúolo parasitóforo (Schwab *et al.*, 1994).

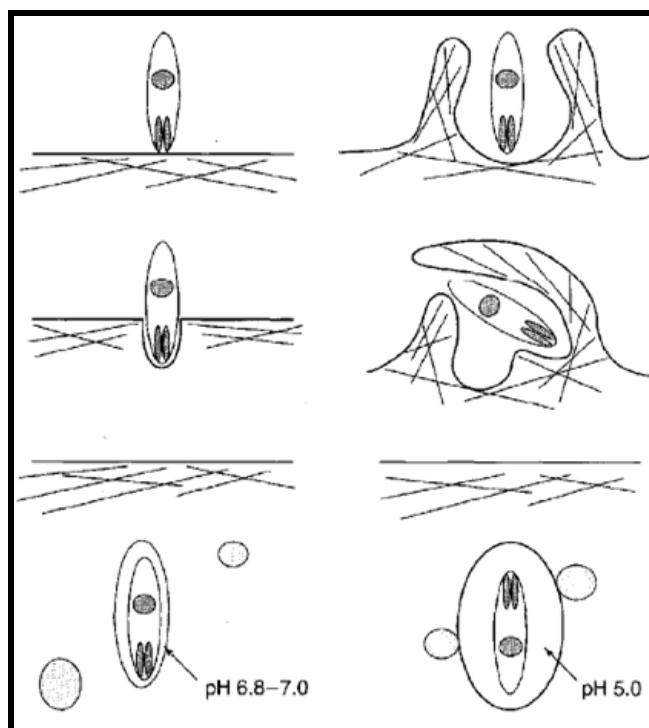
Uma rede tubulovesicular interliga a membrana do parasito e a membrana do vacúolo parasitóforo (Mercier *et al.*, 2002) e funciona como uma via de transporte de

moléculas entre a célula hospedeira e *T. gondii*. Esta conexão é importante para a nutrição do parasito durante seu ciclo celular (Magno *et al.*, 2005). A estabilidade estrutural da rede túbulo vesicular é dada por proteínas provenientes dos grânulos densos, entre outras (revisto por Mercier *et al.*, 2005).

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

Toxoplasma gondii é capaz, ainda, de entrar em células hospedeiras através do mecanismo fagocítico (Esquema 3, lado direito). A invasão de patógenos por fagocitose foi descrita para diversos patógenos intracelulares, como protozoários, vírus e bactérias (Finlay & Cossart, 1997; Antoine *et al.*, 1998, Sibley & Andrews, 2000).

Durante o processo de invasão, *T. gondii* é interiorizado pela célula hospedeira sem que haja reorientação do parasito, diferentemente do que ocorre durante a invasão por penetração ativa, na qual o parasito reorienta-se e sua parte apical entra em contato com a membrana da célula hospedeira, formando, posteriormente, a junção móvel (Sibley, 1998). Na entrada por fagocitose não ocorre a secreção de proteínas pelo parasito (Morisaki *et al.*, 1995). Após a ingestão, forma-se um vacúolo largo ao redor do parasito. Este vacúolo se converte em fagossomo ao qual, posteriormente, fundem-se lisossomos, que liberam diversas enzimas hidrolíticas capazes de destruir o parasito (Sibley *et al.*, 1985; Morisaki *et al.*, 1995, Mordue & Sibley, 1997).



Esquema 3: Mecanismos de invasão do *Toxoplasma gondii*. Na invasão por penetração ativa (esquerda), o parasito entra em contato com a célula através de sua parte apical e ocorre a invaginação da membrana da célula hospedeira, originando o vacúolo parasitóforo não-fusogênico rente ao corpo do parasito e com pH entre 6,8 e 7,0. Durante a invasão por mecanismo endocítico (direita), não ocorre reorientação do parasito, que é fagocitado. Neste processo, ocorre a formação de vacúolo endocítico largo, ao qual fundem-se lisossomos (círculos), tornando seu pH ácido (5,0) (Sibley, 1998).

2.3. O macrófago

O macrófago é uma célula pertencente ao sistema mononuclear fagocítico, com medida típica entre 25 a 50 μm de diâmetro (Yona e Jung, 2010). Sua superfície apresenta grande número de projeções, pseudópodes e invaginações, e o citoplasma grande quantidade de vesículas e vacúolos, que podem ser de reserva ou de secreção (Santos e De Souza, 1983; Yona e Jung, 2010). Elementos de citoesqueleto estão distribuídos pelo citoplasma com forte concentração de filamentos de actina no córtex celular envolvidos na mobilidade dos pseudópodos (De Souza e Benchimol, 1985), no tráfego vesicular e de organelas (Allison *et al.*, 1971). O núcleo do macrófago apresenta-se com formato irregular e em cortes finos

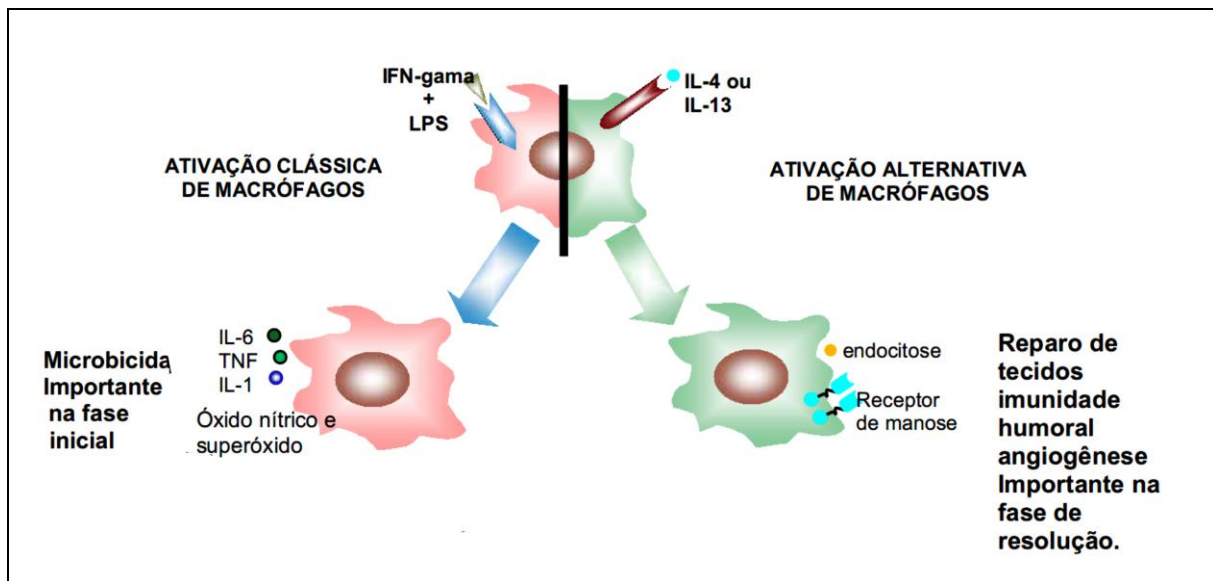
mostra alguns lóbulos. Na microscopia óptica, o macrófago possui um núcleo mais regular, com formato riniforme. A cromatina encontra-se dispersa. Lisossomos estão presentes distribuídos pelo citoplasma. A região do complexo de Golgi é bem desenvolvida, posicionando-se ao redor do centríolo. O retículo endoplasmático rugoso também é bem desenvolvido, estando geralmente perto do núcleo e do complexo de Golgi (Ian, 1973). As mitocôndrias encontram-se em grande número irradiando da região perinuclear para a periferia celular (Carvalho e De Souza, 1989).

2.3.1. Funções: Ativação Clássica X Ativação Alternativa

Macrófagos possuem diferentes funções no organismo, podendo atuar tanto no reconhecimento, destruição de patógenos e apresentação de antígenos quanto na digestão de células em processo de morte celular por apoptose. Estas funções são determinadas por sinalizações específicas, através das quais macrófagos residentes são ativados.

A ativação clássica de macrófagos (Esquema 4, lado esquerdo) o deixa mais microbicida tendo como objetivo primordial a destruição de patógenos e ativação do sistema imunológico do hospedeiro, de forma a eliminar o agente invasor. Após esta ativação, macrófagos têm sua capacidade fagocítica estimulada, produzem óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), IL-1, IL-6 e IL-12.

Na segunda forma de ativação, denominada alternativa (Esquema 4, lado direito), macrófagos secretam o fator homeostático Prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas antiinflamatórias, como TGF- β 1 e IL-10. Tornam-se hiporesponsivos à sinalização inflamatória e possuem função na digestão de células em processo de apoptose, angiogênese e recuperação tecidual (Gordon, 2003). Esta via de ativação também pode ser iniciada com o intuito de evitar danos ao hospedeiro durante processos inflamatórios crônicos (Dal-Pizzol & Felipe M.D., 2004; Hashimoto *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004).



Esquema 4: Duas formas de ativação de macrófagos. Interferon-gamma (IFN-gama) e lipopolissacarídeo (LPS) ativam macrófagos pela via clássica induzindo secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF) e agentes microbicidas (óxido nítrico e superóxido) e têm fundamental importância devido a sua ação microbicida durante a fase inicial de infecções. IL-4 ou IL-13 ativam macrófagos pela via alternativa, induzindo reparo de tecidos, imunidade humoral, e angiogênese importante na fase de resolução de infecções (adaptado de Gordon, 2003).

2.3.2. Mecanismos de destruição de patógenos: resposta imune inata contra *Toxoplasma gondii*

Macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos constituem o primeiro grupo celular a gerar respostas contra patógenos. Células dendríticas ao reconhecerem estes patógenos, secretam a IL-12, enquanto macrófagos e monócitos secretam, além de IL-12, o TNF- α , um co-fator na atividade microbicida. Estas respostas resultam no estímulo da produção de Interferon- γ (IFN- γ) por células Natural Killer (NK). O IFN- γ é responsável por desencadear a atividade celular microbicida, sendo reconhecido por um receptor específico ancorado à membrana de macrófagos, monócitos e neutrófilos (Suzuki *et al*, 1988). Após a ligação do IFN- γ ao receptor, ocorre a ativação de um fator de transcrição nuclear, o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), capaz de controlar a expressão de diferentes genes. Em resposta a atividade do STAT1, ocorre o

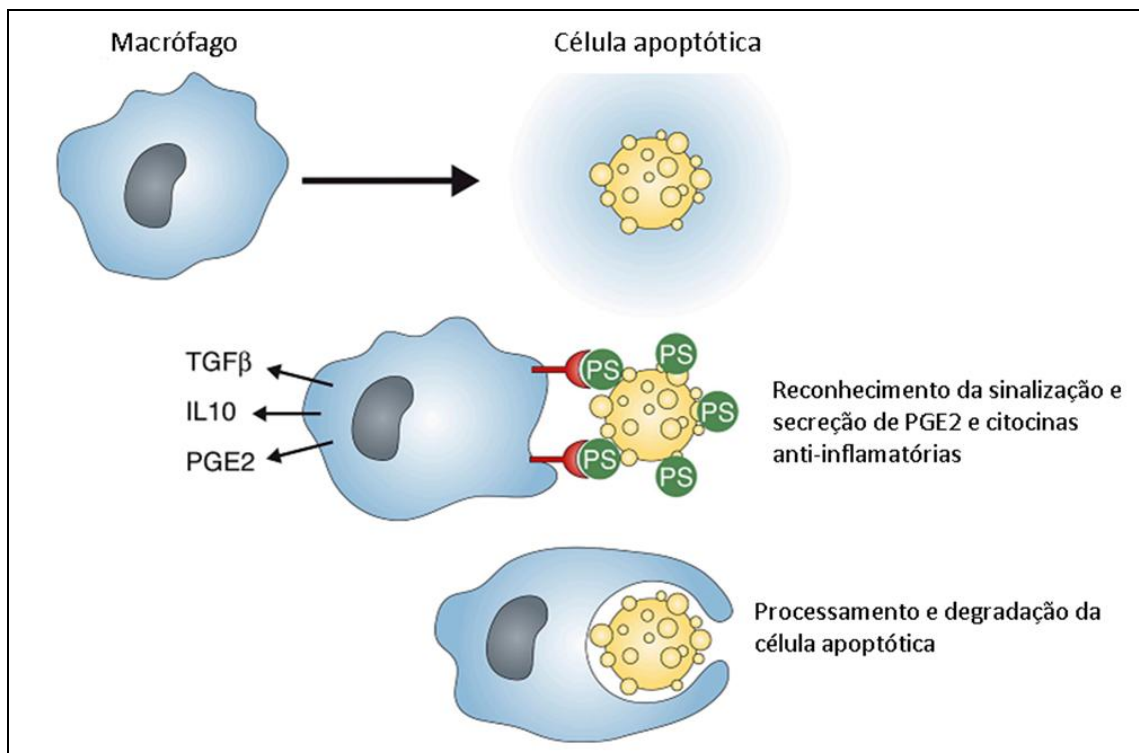
estímulo para a produção de NO e ROS, que são capazes de causar danos expressivos em patógenos (Adams, 1990). Ocorre, ainda, um estímulo para produção de proteínas de defesa denominadas p67 guanylate-binding e GTPases relacionadas com a imunidade (IRGs) que, através da ATG5 (proteína relacionada à autofagia), também são responsáveis pela eliminação de parasitos (Shenoy *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2012).

2.3.3. Processamento de células apoptóticas

A origem etimológica da palavra apoptose é do grego arcaico, significando “o ato de cair”, estando relacionada à queda das folhas das árvores durante o outono e sugere, no contexto celular, que a morte celular é essencial e favorável para o desenvolvimento de seres multicelulares. Apoptose é um mecanismo regulado pelo organismo conhecido como “morte celular programada”, através do qual células indesejáveis são eliminadas, de modo a promover o bom funcionamento do organismo (Kerr *et al.*, 1972).

O processo de apoptose celular pode ter início por duas vias distintas. Na via intrínseca, após o estímulo apoptótico, há perda do potencial de membrana da mitocôndria e ativação de caspases, enzimas capazes de clivar substratos protéicos (Ernshaw *et al.*, 1999; Donnelly *et al.*, 2000). Na via extrínseca, o processo apoptótico inicia-se com a transdução do sinal de morte para o interior da célula através de receptores específicos (receptores de morte), localizados na membrana celular. O sinal é reconhecido pelo domínio de morte de moléculas adaptadoras, que recrutam e ativam complexos indutores de morte, que promovem a ativação de caspases (Ernshaw *et al.*, 1999). Após a ativação de caspases, em ambas as vias, ocorre a exposição do fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS), condensação da cromatina, desintegração da parede nuclear e o DNA é clivado por endonucleases (Koopman, 1994).

Macrófagos ao reconhecerem e se ligarem a PS na face extracelular da célula apoptótica, são ativados alternativamente, induzindo a produção e secreção das citocinas antiinflamatórias IL-10 e TGF- β 1 em sua forma ativa (Bermudez *et al.*, 1993) e do fator homeostático PGE2, inibindo, assim, a síntese de TNF- α . Em seguida, a célula apoptótica é endocitada e digerida sem que haja processo inflamatório (Esquema 5) (McDonald *et al.*, 1999).



Esquema 5: Reconhecimento e processamento de células apoptóticas por macrófagos. Macrófagos são atraídos por células em processo de apoptose. Estas células expõem fosfatidilserina (PS) na face externa de sua membrana plasmática. Macrófagos ao se ligarem a PS da célula apoptótica são ativados de forma alternativa, secretando citocinas antiinflamatórias como PGE2, TGF- β 1 ativo e IL-10. Após a inibição da resposta inflamatória do organismo, a célula em apoptose é engolfada, processada e digerida pelos macrófagos.

2.4. Interação parasito célula hospedeira

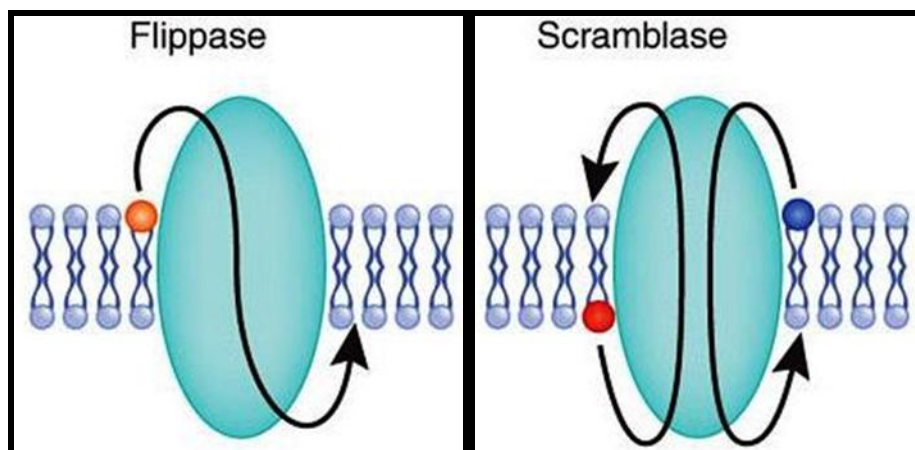
A fagocitose por células hospedeiras é uma das primeiras barreiras que protozoários invasores precisam burlar para sobreviver. Esse processo de entrada se inicia com a adesão do microorganismo na superfície celular do macrófago. Após adesão à superfície e ingestão do protozoário, ocorre à formação do vacúolo fagocítico, que se funde com lisossomos. As enzimas lisossomais degradam o que se encontra no interior do fagolisossomo (De Souza, 1994; Sacks e Sher, 2002). *Trypanosoma cruzi* possui mecanismo de escape do vacúolo através da secreção do peptídeo Tc-TOX, que cria poros na membrana do vacúolo fagocítico (Sacks e Sher, 2002), possibilitando a saída do parasito sem danos expressivos e seu posterior desenvolvimento no citoplasma (De Souza, 1994; Sacks e Sher, 2002). *Toxoplasma*

gondii modifica o vacúolo fagocítico através da secreção de proteínas durante a invasão, evitando a fusão de lisossomos e acidificação. Por outro lado, *Leishmania* consegue sobreviver dentro de vacúolos acidificados, contendo enzimas lisossomais e atividade hidrolítica (De Souza, 1994; Sacks e Sher, 2002).

Foi descrito que amastigotas (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006) e promastigotas metacíclicas (Wanderley *et al.*, 2010) de *Leishmania amazonensis* expõem o fosfolípido PS do lado externo da membrana plasmática, que está relacionado com a capacidade de invadir células hospedeiras por macropinocitose (Wanderley *et al.*, 2006, 2010). Esta exposição também foi descrita nas formas infectivas do *T. cruzi* (DaMatta, *et al.*, 2007).

A exposição de PS na superfície da membrana plasmática de células apoptóticas é o principal evento para indicar morte celular por apoptose (Clark, 2011). Esta exposição é fundamental para que o TGF- β 1 sinalize e induza à resposta anti-inflamatória durante a fagocitose de células apoptóticas (Frey e Gaipf, 2011). Ao expor PS, os parasitos utilizam o mecanismo denominado “mimetismo apoptótico”, reproduzindo, assim, a sinalização empregada por células em processo de apoptose, inibindo a atividade inflamatória do macrófago (Mercer *et al.*, 2008; Wanderley *et al.*, 2010). No entanto, não é descrito se o mecanismo de translocação de PS em parasitos é dependente da atividade de flippases, como ocorre em células eucariotas (revisto por Clark, 2011).

Durante o ciclo de vida da célula eucariota, a flippase é responsável pela translocação de PS para a face intracelular da membrana plasmática. Quando a célula entra em processo de apoptose, a atividade da flippase é inibida e a PS é translocada para o meio extracelular da membrana plasmática através de scramblases (Esquema 6) (revisto por Clark, 2011).



Esquema 6: Enzimas capazes de translocar fosfatidilserina em membranas biológicas. Flippases utilizam ATP para translocar PS (Laranja) e, raramente fosfatidiletanolamina, da face externa para a face interna da membrana plasmática. Scramblases são independentes de ATP, menos específicas ao substrato e facilitam o movimento de diferentes lipídios a favor de seus gradientes de concentração, possibilitando a translocação de PS da face interna para a face externa da membrana e vice-versa (Adaptado de Clark, 2011).

Nosso grupo tem mostrado que o mecanismo utilizado por *T. gondii* para inibir a produção de NO em macrófagos ativados é similar ao apresentado na *Leishmania* quanto à dependência da exposição de PS. Estudos da interação de macrófagos com *T. gondii* vem demonstrando que o parasito também possui capacidade de inibir a ativação clássica de macrófagos. Macrófagos de camundongo ativados com IFN- γ e LPS infectados com taquizoítos de *T. gondii* tem a produção de NO inibida devido à redução da expressão da iNOS (Seabra *et al.*, 2002). O mecanismo de degradação da iNOS e a consequente inibição da produção de NO é através do TGF- β 1 secretado pelos macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2004). Estes protozoários parasitos possuem mecanismos de invasão muito investigados, tais como, fagocitose (Joiner e Dubremetz, 1993; Sacks e Sher, 2002), na qual o parasito não tem participação ativa na entrada, e também penetração ativa, onde o parasito entra em contato com a membrana da célula hospedeira, força-a, formando vacúolo rente ao seu corpo (Morisaki *et al.*, 1995; Sacks e Sher, 2002).

A partir desses resultados referentes à modulação da ativação de macrófagos de murinos, este trabalho visa elucidar os aspectos da infecção *in vitro* e *in vivo* da subpopulação de *T. gondii* que expõe e da que não expõe PS.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Caracterizar a infecção *in vitro* e *in vivo* de subpopulações de *T. gondii* que expõem ou não fosfatidilserina (PS).

3.2. Objetivos Específicos:

- 3.2.1. Avaliar a eficiência da metodologia de isolamento das subpopulações de parasitos PS+ e PS- por citometria de fluxo;
- 3.2.2. Analisar qual é o mecanismo de invasão em células hospedeiras das diferentes subpopulações de *T. gondii* por microscopias óptica e eletrônicas de transmissão e varredura;
- 3.2.3. Avaliar a produção de NO, pelo método de *Griess*, por macrófagos peritoneais murinos ativados após infecção com as subpopulações PS+ ou PS-;
- 3.2.4. Verificar a morfologia dos vacúolos parasitóforos de macrófagos após infecção com as subpopulações de parasitos por microscopias óptica e eletrônicas de transmissão e varredura;
- 3.2.5. Avaliar o comportamento *in vivo* da infecção pelas subpopulações isoladas de *T. gondii* verificando sobrevivência, carga parasitária e inflamação através de análise patológica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Macrófagos peritoneais e LLC-MK2

Macrófagos peritoneais foram obtidos após lavagem peritoneal de camundongos suíços com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após 1h de adesão a 37° C, as células foram lavadas com solução de Hanks e cultivadas com DMEM contendo 5% de SFB a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂. O uso de camundongos nesses experimentos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UENF (protocolo 98). Linhagem de células epiteliais de rim de macaco *Rhesus* (LLC-MK2) foram mantidas em frascos de cultura de células de 25 cm² com DMEM contendo 10% SFB. Em alguns experimentos, macrófagos foram cultivados nos mesmos frascos.

4.2. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) foram mantidos e obtidos na cavidade peritoneal de camundongos com passagens de 2 a 3 dias. Após este período, a cavidade peritoneal foi lavada com DMEM seguido por centrifugação a 100g por 5 min. O sobrenadante foi centrifugado a 1000g por 10 min. Parasitos foram ressuspensos em DMEM e contados em câmara de Neubauer.

4.3. Isolamento das subpopulações PS+ e PS- e análise da eficiência do mecanismo de separação por citometria de fluxo

Parasitos foram coletados de camundongos infectados, como descrito acima, e 2 x 10⁸ taquizoítos foram incubados em tampão contendo cálcio a 2,5 mM com annexina V conjugada a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). Após 40 min, a suspensão de células foi adicionada a uma coluna magnética, mantendo apenas os parasitos PS+ aderidos à coluna; parasitos PS- foram eluídos e coletados. Parasitos PS+ foram removidos da coluna conforme as instruções do fabricante. As duas subpopulações foram lavadas por centrifugação com PBS. Para análise da eficiência do método de isolamento das subpopulações por citometria de fluxo, os parasitos resgatados após a separação magnética foram centrifugados (1000g por 10 min) e ressuspensos em PBS para lavagem e remoção do cálcio do meio e, conseqüentemente, dos marcadores magnéticos ligados aos parasitos. Após, estes

parasitos foram incubados com annexina-V FITC, por 1 h, com iodeto de propídio por 1 min, e foi feita análise por citometria de fluxo (FACScalibur, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO), na qual foram quantificados 10000 eventos nos filtros FL1 (verde) e FL2 (vermelho), em escala logarítmica. Histogramas foram plotados posteriormente no software WinMDi, para PC.

4.4. Ativação de macrófagos peritoneais e interação com parasitos

Interações foram realizadas com macrófagos não-ativados (residentes) e macrófagos ativados por 24h logo após a adesão. A ativação foi realizada com 50 U/ml de IFN- γ recombinante de camundongo (Sigma) e 100 ng/ml de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (0111:B4, LPS, Sigma). As células foram lavadas e foi adicionada as subpopulações PS-, PS+ ou a população total de taquizoítos, com uma proporção de 10 parasitos para 1 macrófago durante 1 e 24h. Em alguns experimentos macrófagos foram incubados com concentrações crescentes de Dynasore, um inibidor de macropinocitose (Kirchhausen *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2009), por 1h antes e durante a interação.

4.5. Preparo de amostras para análise morfológica e determinação do índice de infecção

Após a interação as células foram fixadas com metanol, lavadas, coradas com Giemsa (diluído 10 vezes em água destilada), desidratadas em uma série de soluções acetona-xilol, montadas em Entellan e observadas em um microscópio óptico Axioplan - ZEISS. Imagens foram capturadas com uma câmera digital MRC5 AxioCam e processadas com o programa Axiovision. O percentual de células infectadas e o número de parasitos intracelulares por macrófago foram contados e o índice de infecção foi obtido multiplicando esses dois números. O número de vacúolos estreitos ou largos contendo *T. gondii* também foi contado após interação de 1 h. O teste *t* de Student e análise de variância (ANOVA) foram utilizados para comparar valores médios, $p < 0,05$ foi considerado significativo. Lamínulas contendo macrófagos infectados foram fixadas por 1h em 4% de formaldeído recentemente preparado, glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. As células foram desidratadas em acetona, secas em ponto crítico e tiveram uma porção da membrana removida com fita adesiva (Caldas *et al.*, 2009), revelando a organização interna dos vacúolos parasitóforos. Depois disso, as células foram

metalizadas com ouro por pulverização catódica (25 nm de espessura) e observadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol 6490 JSM LQ (Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO).

4.6. Análise da produção de óxido nítrico

A produção de NO foi avaliada indiretamente através da leitura de nitrito no sobrenadante de cultura pelo reagente de Griess. Os sobrenadantes foram misturados na proporção de 1:1 com o reagente de Griess (1 volume de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% em água deionizada com igual volume de 0,1% N-[1-naftil] etilenodiamina em água deionizada). Após 10 minutos, a mistura foi lida em um leitor de ELISA (540 nm) e a quantificação da produção de NO foi baseada em uma curva padrão de nitrito de sódio em DMEM.

4.7. Teste *in vivo*

Camundongos C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com 10^4 da subpopulação PS-, PS+ ou a população total de taquizoítos. A morte dos camundongos foi registrada diariamente e baços e fígados dos camundongos recém-mortos foram coletados e processados para microscopia eletrônica de transmissão e microscopia óptica. A curva de sobrevivência foi analisada pelo método *Kaplan Meier* no programa MedCalc, para PC.

4.8. Microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão

Interações de LLC-MK2 ou macrófagos com subpopulações de *T. gondii* (30 min) foram lavadas e fixadas com a mesma solução utilizada para microscopia eletrônica de varredura (item 4.6). Pequenos fragmentos de baços e fígados foram fixados com a mesma solução. Amostras foram lavadas, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, desidratadas com acetona e incorporadas em resina epóxi. Cortes semi-finos foram corados com solução de 1% de azul de toluidina (microscopia óptica) e seções ultrafinas (80nm) foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (microscopia eletrônica de transmissão). Cortes ultrafinos foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit 120KV (Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO). Médias e desvios padrão do número de macrófagos, linfócitos e taquizoítos presentes nas amostras de fígado e baço foram obtidas através de contagem desses tipos celulares em seis campos

microscópicos (área = $4.5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$) de cinco cortes semi-finos distantes por microscopia óptica.

5. RESULTADOS

5.1 – Avaliação do grau de pureza das subpopulações de parasitos isolados

O método de isolamento das subpopulações de taquizoítos foi analisado por citometria de fluxo. A subpopulação PS+ (Figura 1A) mostrou grande marcação por annexina-V (linha cinza), em relação aos parasitos controle, que não foram incubados com annexina-V (linha preta), indicando que a subpopulação isolada expõe elevados níveis de PS. O grau de pureza dessa subpopulação foi de 96%. Além disso, a subpopulação PS- isolada não apresentou marcação pela annexina (Figura 1B), indicando que a subpopulação isolada não expõe PS (linha cinza). Foi obtida pureza de 98% na subpopulação PS-.

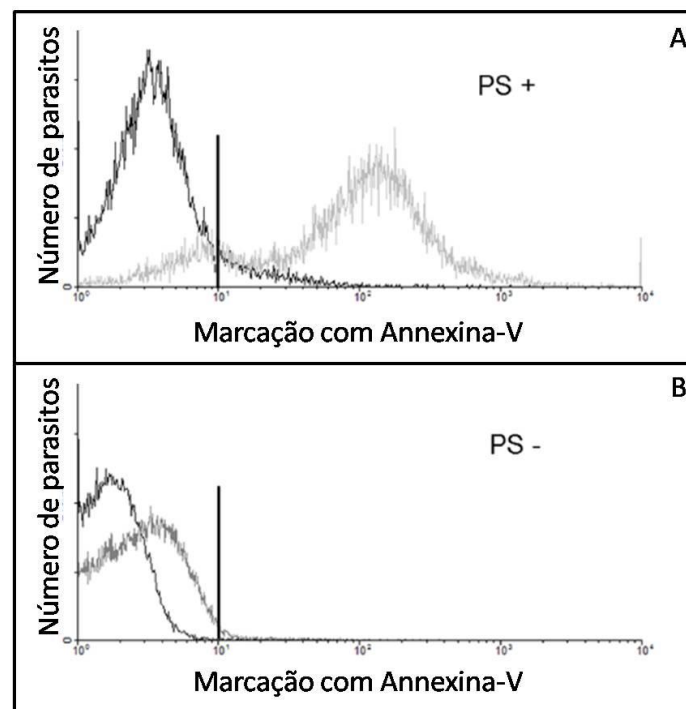


Figura 1. Subpopulações fosfatidilserina (PS)+ e PS- de *Toxoplasma gondii* foram magneticamente separadas e analisadas por citometria de fluxo após marcação com annexina-V. (A) Subpopulação PS+ de *T. gondii*. (B) Subpopulação PS- de *T. gondii*. Linhas pretas representam as subpopulações parasitos controle, sem marcação com annexina-V. Linhas cinza referem-se às subpopulações marcadas com annexina-V. Resultado de uma em cinco repetições do experimento.

5.2 – Análise do mecanismo de invasão das subpopulações de *T. gondii* e capacidade de inibir a produção de NO em células hospedeiras.

Ambas subpopulações de taquizoítos infectaram menos macrófagos após 1 h de interação quando comparadas a infecção com a população total de parasitos (Figura 2A e 2B). No entanto, a subpopulação PS+ desenvolveu-se melhor nos macrófagos após 24 e 48 h, quando comparado com a subpopulação PS- (Figura 2B). Para entender melhor o mecanismo de entrada de ambas as subpopulações de *T. gondii* em macrófagos residentes, utilizamos o Dynasore antes e durante a interação. Dynasore é uma droga que inibe a dinamina (Kirchhausen *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, processos endocíticos, como a fagocitose. Não houve alteração na capacidade de entrada da subpopulação PS+ com a variação da concentração da droga no meio (Figura 2C). Por outro lado, o índice de invasão dos parasitos PS- diminuiu de acordo com a concentração crescente de Dynasore no meio (Figura 2D). Além disso, apenas a subpopulação PS+ foi capaz de inibir a produção de NO após 24 e 48 h de infecção em macrófagos ativados (Figura 2E).

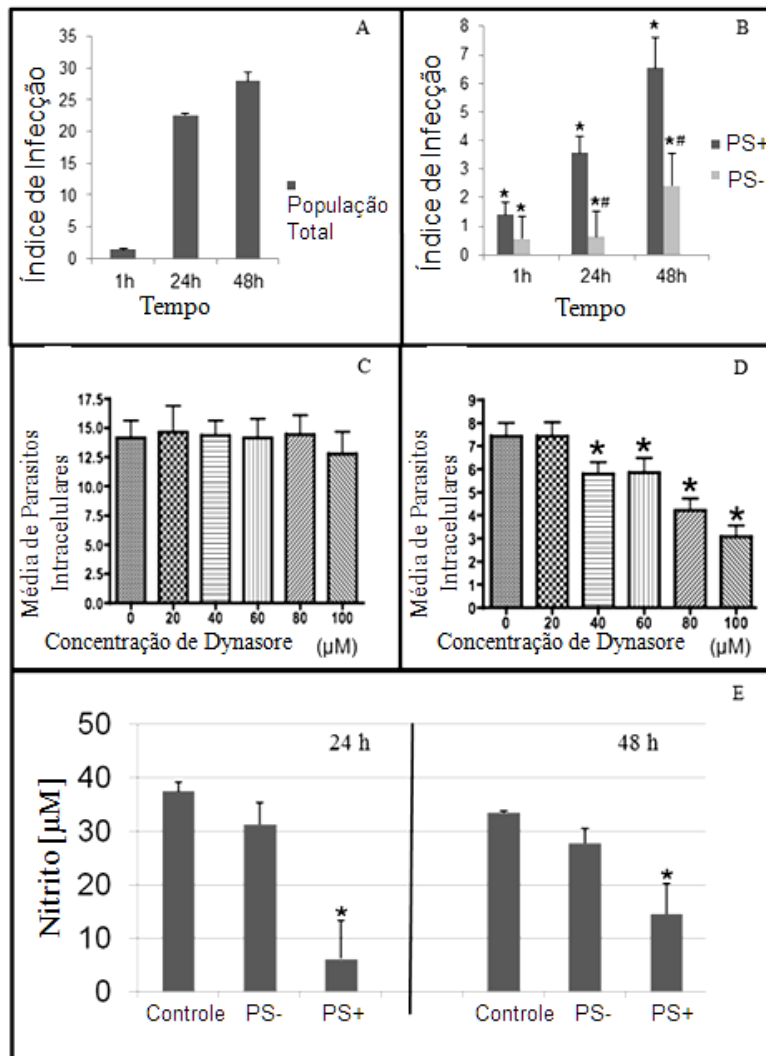


Figura 2. Interação da população total e subpopulações PS+ ou PS- de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* com macrófagos murinos. Índice de infecção em macrófagos residentes após interação com a população total de parasitos (A) e após interação com subpopulações PS+ ou PS- de *T. gondii* (B). * Diferença significativa em relação à população total ($p \leq 0,05$) pela ANOVA. # Diferença significativa da subpopulação PS+ ($p \leq 0,05$) pela ANOVA. Média de parasitos intracelulares em macrófagos residentes que interagiram com a subpopulação PS+ (C) ou subpopulação PS- (D) de *T. gondii* na presença de Dynasore. * Diferença significativa em relação ao índice de infecção da interação com a subpopulação PS+ ($p \leq 0,05$) pela ANOVA. (E) Produção de NO por macrófagos ativados não infectados ou após interação com as subpopulações PS+ ou PS- de *T. gondii*. * Diferença significativa dos valores obtidos em macrófagos não infectados ($p \leq 0,05$) pelo teste *t* de Student. Resultados de pelo menos três experimentos independentes.

5.3 - Avaliação por microscopia do mecanismo de entrada das subpopulações de *T. gondii* em células hospedeiras

Parasitas PS- foram observados dentro de grandes vacúolos após interação de 1 h com macrófagos (Figuras 3 e 5B). Diferentemente, a subpopulação de parasitos PS+ foi observada em vacúolos justos após interação com macrófagos (Figuras 4, 5A e 6A). Vacúolos grandes e justos foram quantificados por microscopia de óptica após interações com as subpopulações. A interação com a subpopulação PS- (Figura 3A, inset) resultou em cerca de 76% de vacúolos grandes, enquanto a subpopulação PS+ (Figura 4A, inset) apresentou cerca de 78% de vacúolos justos. Na interação das subpopulações isoladas com a linhagem celular não-fagocítica LLC-MK2 observou-se por microscopia eletrônica de transmissão que somente os parasitos PS+ foram capazes de invadir estas células (Figura 6A). Os parasitos PS- somente foram capazes de aderir a estas células (Figura 6B).

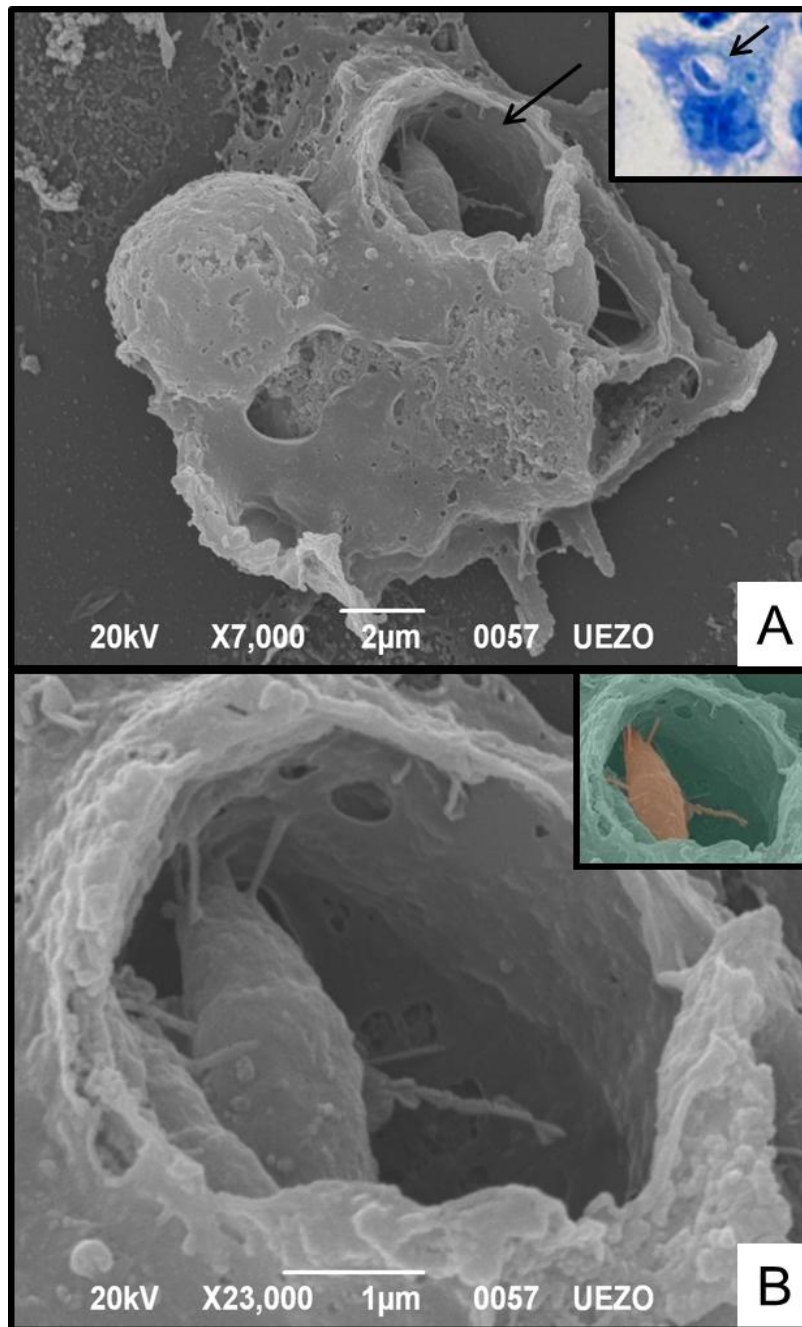


Figura 3: Microscopia óptica e eletrônica de varredura de vacúolos de macrófagos após interação com subpopulação PS- de *T. gondii*. (A) Observe o vacúolo largo ao redor do parasito (seta), indício de entrada por processo endocítico (*inset* – microscopia óptica). (B) Ampliação da figura A e colorização (*inset* – verde = macrófago, laranja = *T.gondii*). Imagens representativas de três experimentos independentes.

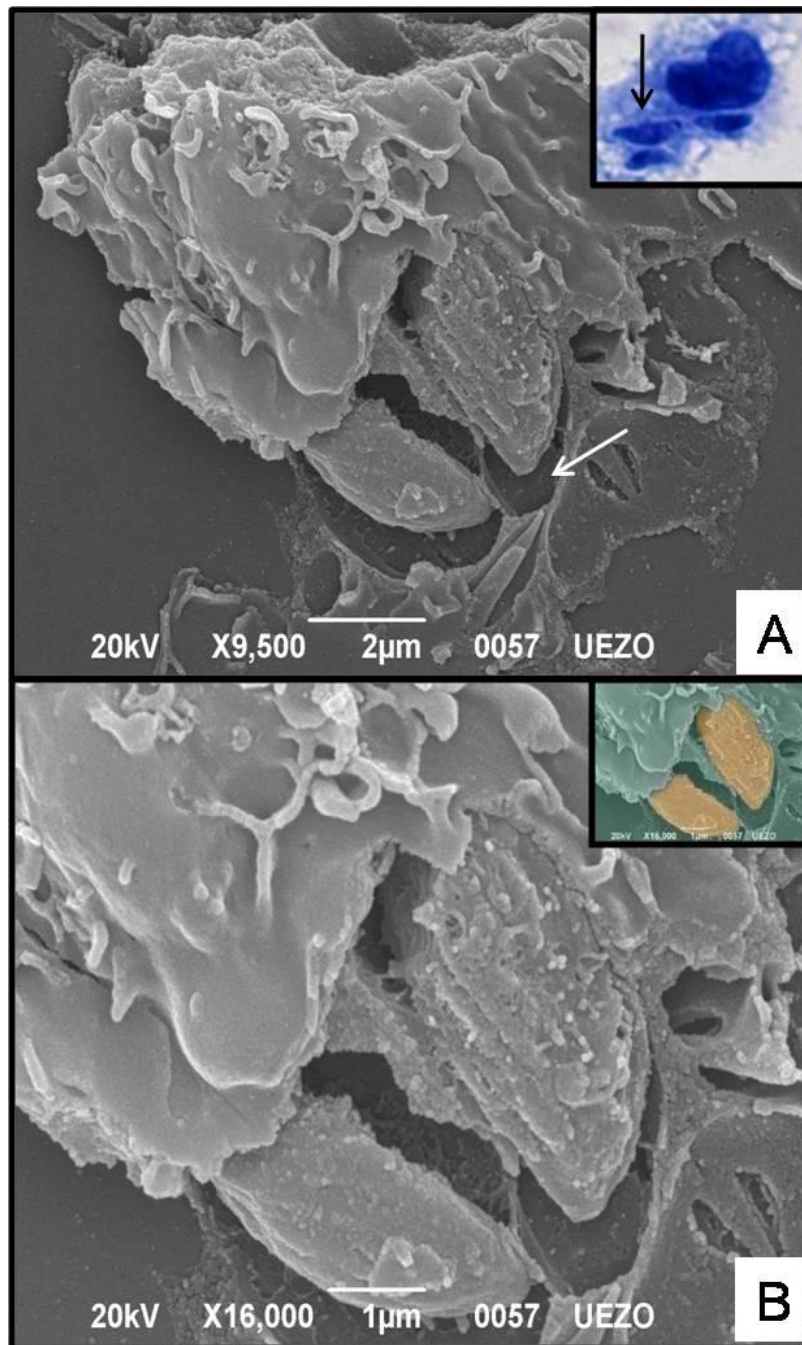


Figura 4: Microscopia óptica e eletrônica de varredura vacúolos de macrófagos após interação com subpopulação PS+ de *T. gondii*. (A) Observe vacúolos estreitos ao redor do parasito, indicando penetração ativa (*inset* – microscopia óptica). (B) Ampliação da imagem A e colorização (*inset* - verde: = macrófago, laranja = *T.gondii*). Imagens representativas de três experimentos independentes.

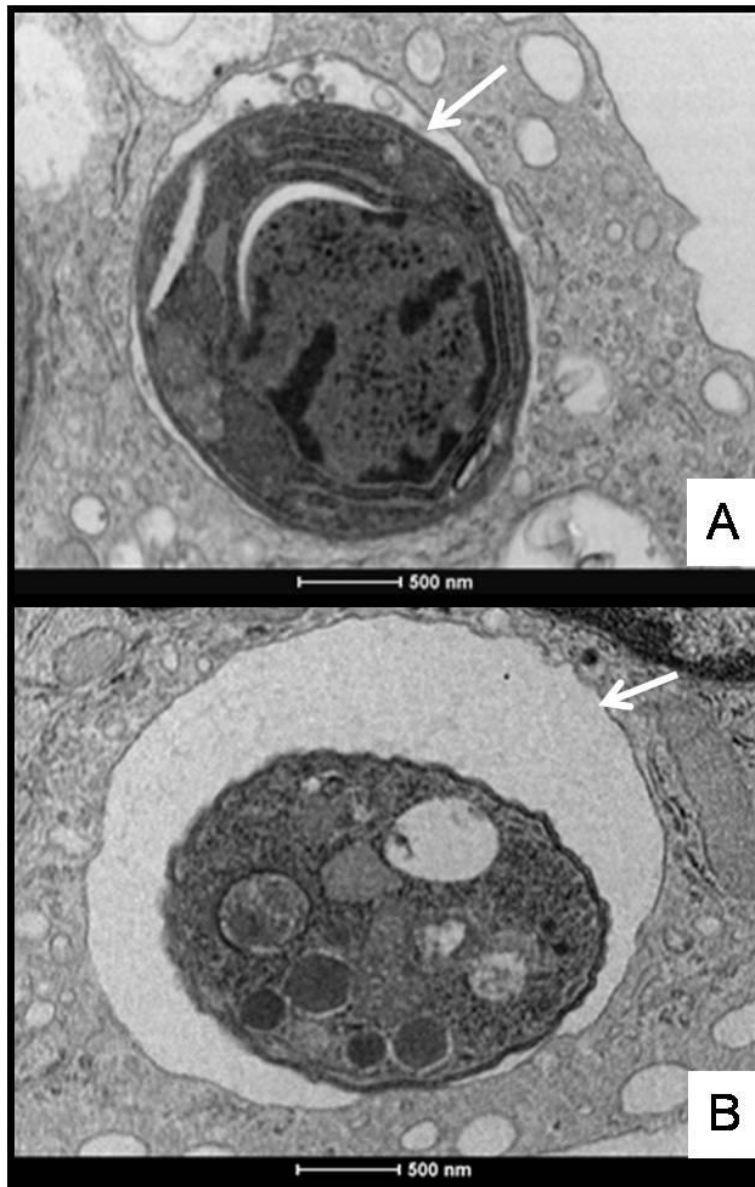


Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão das subpopulações isoladas de *Toxoplasma gondii* após interação com macrófagos. (A) Interação de macrófagos com subpopulação PS+ de *T. gondii*. Note vacúolo justo ao corpo do parasito (seta). (B) Interação de macrófagos com subpopulação PS- de *T. gondii*. Note vacúolos largos ao redor do parasito. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

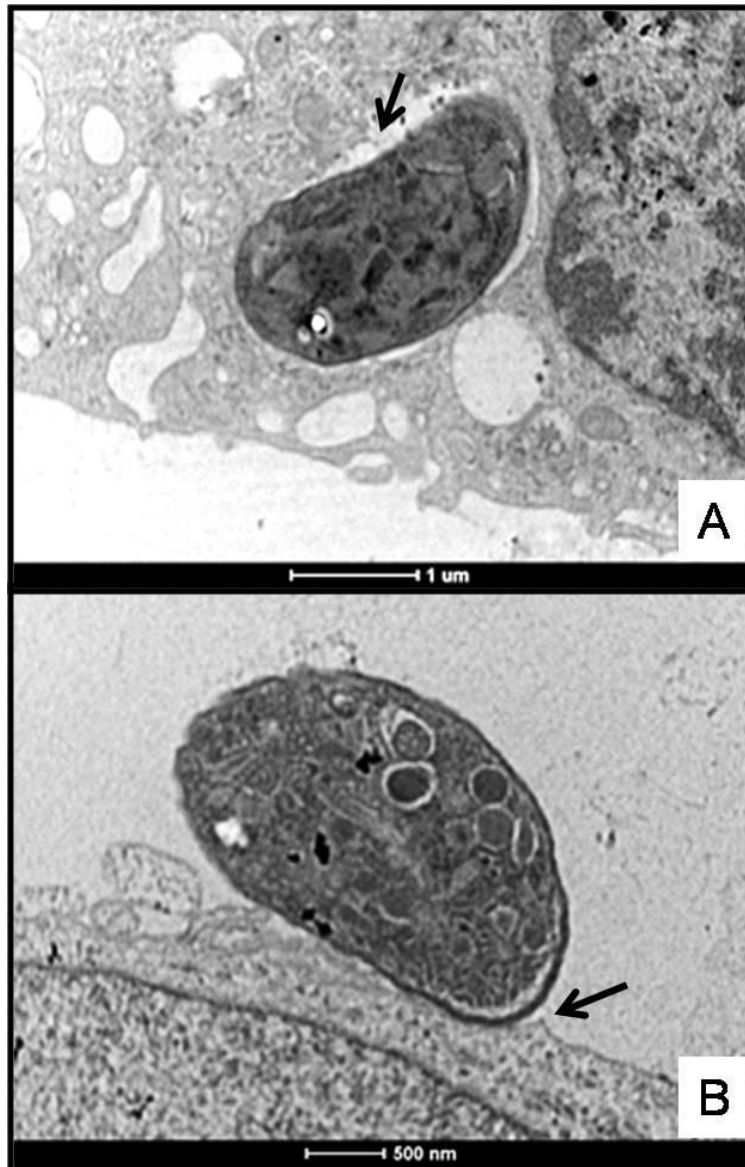


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão das subpopulações isoladas de *Toxoplasma gondii* após interação com linhagem de células não-fagocíticas LLC-MK2. (A) Interação de células LLC-MK2 com subpopulação PS+ de *T. gondii*. Observe vacúolos justos após interação de células hospedeiras com tachizoítos PS+ (seta); B: Interação de células LLC-MK2 com subpopulação PS- de *T. gondii*. Tachizoítos PS- não foram capazes de invadir células LLC-MK2 (seta). Imagens representativas de dois experimentos independentes.

5.4 – Análise in vivo da infecção originada pelas subpopulações isoladas de *T. gondii*

Camundongos infectados com as subpopulações PS+ ou PS- de *T. gondii* sobreviveram por cinco dias, enquanto camundongos infectados com a população total de parasitos sobreviveram por sete dias (Figura 7). Imediatamente após a morte dos camundongos, baços e fígados foram coletados para análise patológica. Leucócitos do infiltrado inflamatório e parasitos foram contados e os números de células foram comparados entre os tecidos de camundongos infectados com as subpopulações de parasitos e com a população total (Tabela 1).

Macrófagos e linfócitos foram os únicos tipos de leucócitos observados. No entanto, somente o número de macrófagos apresentou diferença significativa entre as infecções. A infecção com a subpopulação PS- resultou em aumento significativo de macrófagos em relação à infecção com a população total (Figuras 8A, 10A e Tabela 1). Baços infectados com a subpopulação PS+ apresentaram redução significativa do número de macrófagos e aumento significativo de taquizoítos em relação à infecção originada pela população total de parasitos (Figura 9A, 10A e Tabela 1).

No fígado, a infecção com a subpopulação PS- gerou aumento significativo do número de macrófagos e diminuição significativa do número de taquizoítos em relação à infecção originada pela população total de parasitos (Figuras 8B, 10B e Tabela 1). Na infecção com a subpopulação PS+, houve diminuição significativa do número de macrófagos e aumento significativo do número de taquizoítos em relação à infecção gerada pela população total de parasitos (Figuras 9B, 10B e Tabela 1).

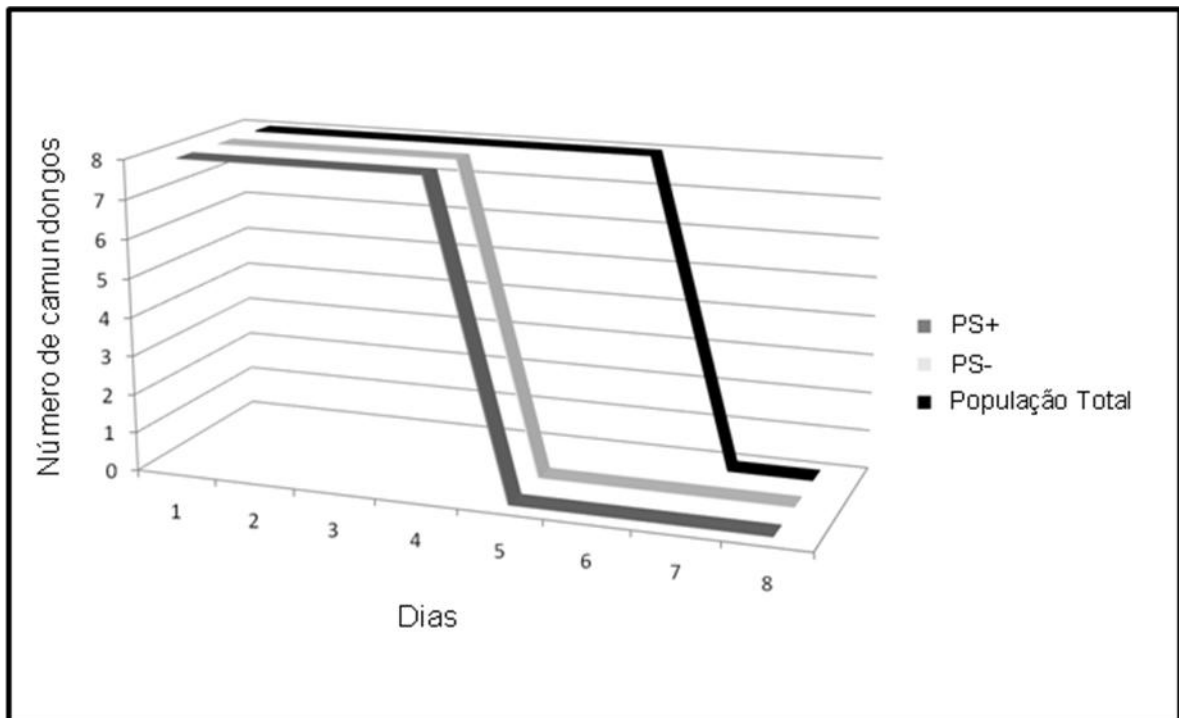


Figura 7: Curva de sobrevivência de camundongos após a infecção com *Toxoplasma gondii*. Camundongos infectados com as subpopulações isoladas do parasito morreram no quinto dia após a infecção, enquanto camundongos infectados com a população total de taquizoítas persistiram até o sétimo dia após a infecção. Significância comprovada pela curva de sobrevivência *Kaplan Meier* ($p = 0,0273$).

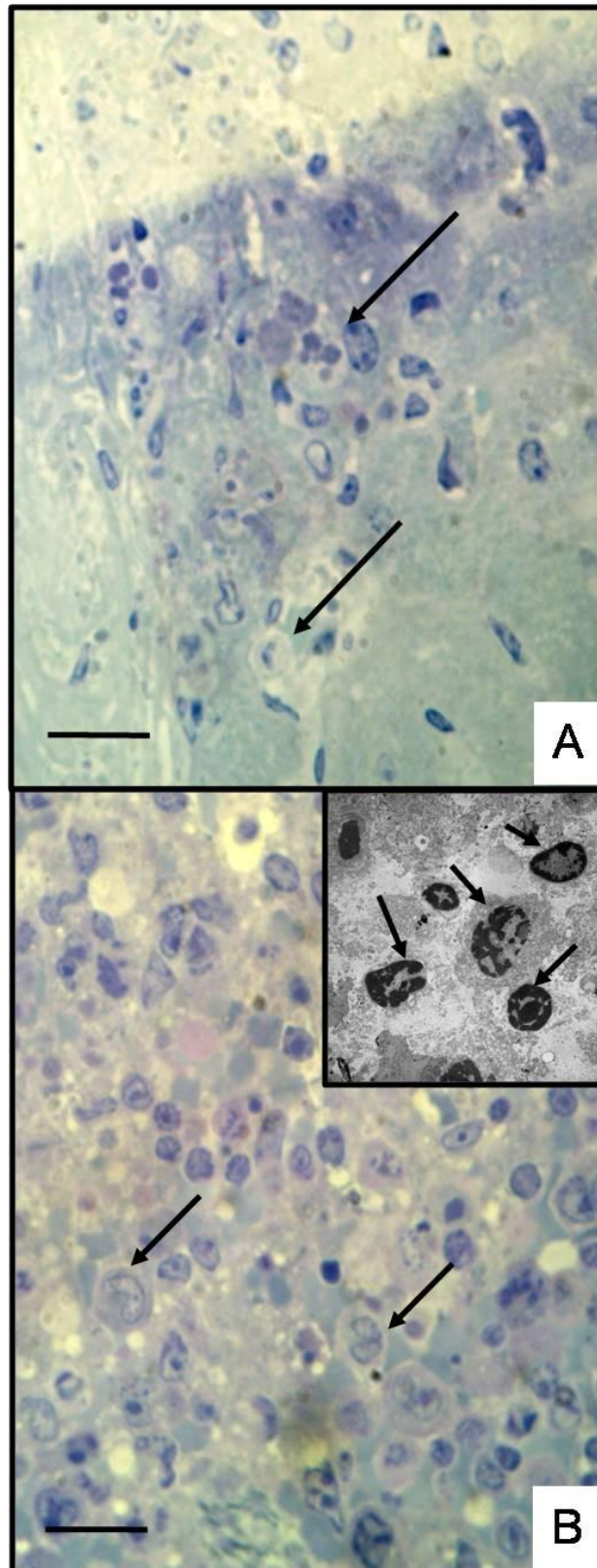


Figura 8: Análise patológica de baço (A) e fígado (B) de camundongos C57/BL6 após interação com a subpopulação PS- de *Toxoplasma gondii*. Note a presença de grande quantidade de células inflamatórias (setas). Barras = 100 µm. *Inset* – microscopia eletrônica de transmissão. Resultados de dois experimentos independentes, com 6 animais cada.

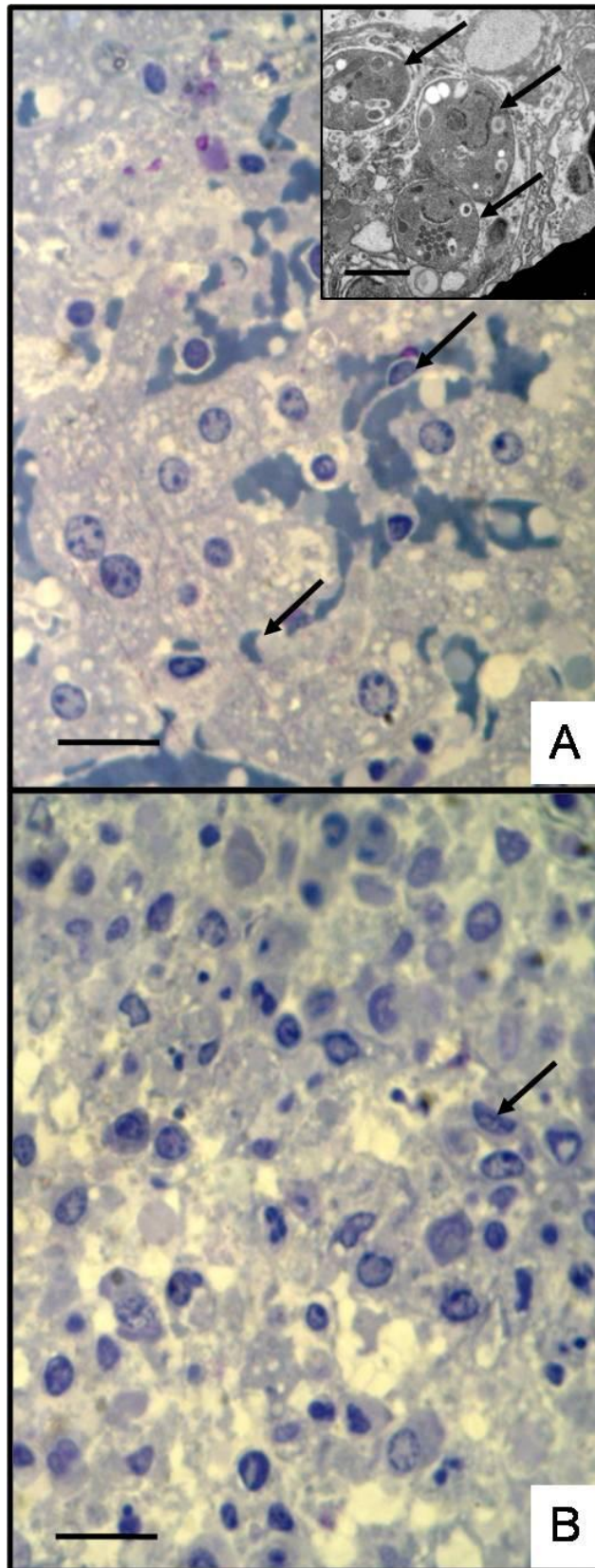


Figura 9: Análise patológica de baço (A) e fígado (B) de camundongos C57/BL6 após interação com a subpopulação PS+ de *Toxoplasma gondii*. Note a presença de grande quantidade de parasitos (setas). Barras = 100 μ m. *Inset* – microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 2 μ m. Resultados de dois experimentos independentes, com 6 animais cada.

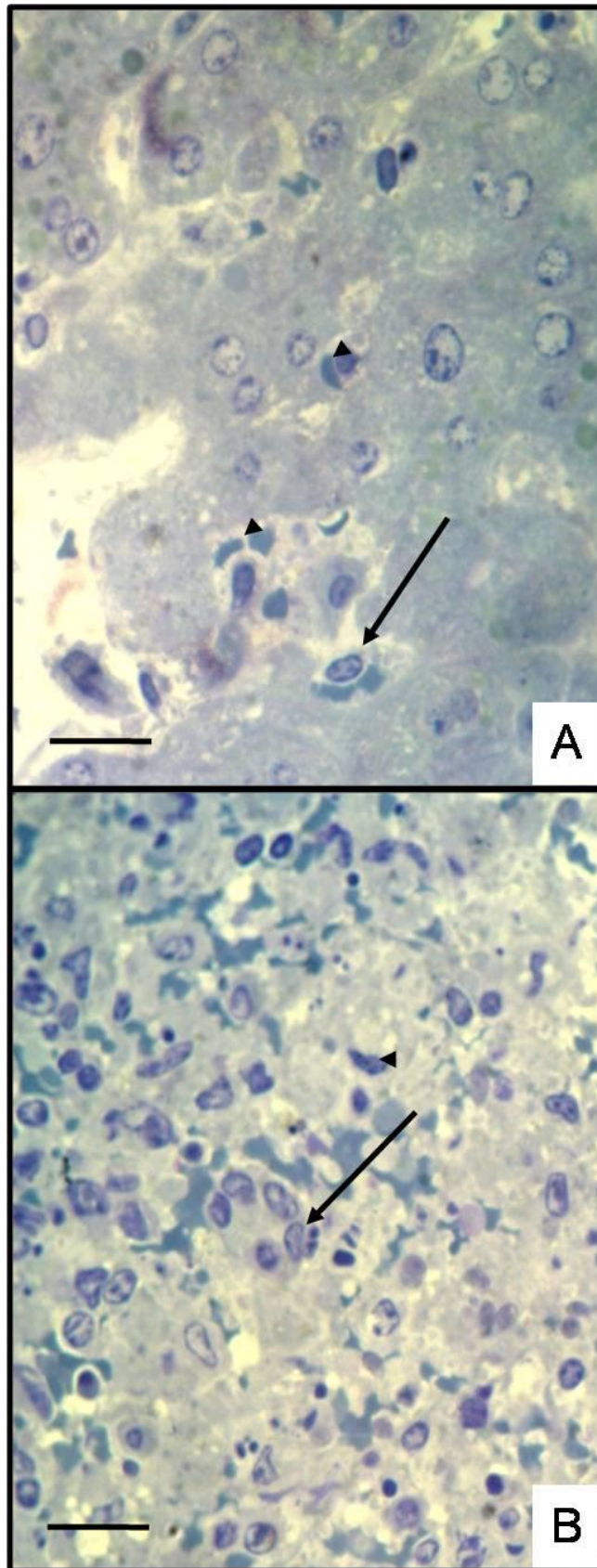


Figura 10: Análise patológica de baço (A) e fígado (B) de camundongos C57/BL6 após interação com a população total de *Toxoplasma gondii*. Note a presença de parasitos (cabeças de seta) e células inflamatórias (setas). Barras = 100 μ m. Resultados de dois experimentos independentes, com 6 animais cada.

Tabela 1. Número médio de macrófagos, linfócitos e taquizoítos por campo microscópico no baço e no fígado de camundongos infectados com a população total de *Toxoplasma gondii* e as subpopulação PS+ ou PS-.

	População total	PS+	Alteração em relação a população total	PS-	Alteração em relação a população total
Baço					
Macrófagos	11.0 ± 1.40	4.0 ± 2.80*	- 2.75	21.0 ± 3.78*	+ 1.91
Linfócitos	9.5 ± 10.6	22.0 ± 1.4	-	17.5 ± 3.5	-
Taquizoítos	5.0 ± 0.10	11.0 ± 0.25*	+ 2.20	3.5 ± 3.5	-
Fígado					
Macrófagos	18.0 ± 1.00	6.0 ± 4.20*	- 3.00	34.0 ± 7.10*	+ 1.89
Linfócitos	14,0 ± 7,1	27,5 ± 19,0	-	24.5 ± 10.6	-
Taquizoítos	6.0 ± 0.01	16.0 ± 5.60*	+2.67	3.0 ± 0.01*	- 2.00

a. Tecidos de camundongos processados para microscopia eletrônica de transmissão foram cortados, corados, diferentes células foram contadas por campo microscópico, em microscopia óptica (área = $4,5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$), e o desvio padrão médio foi calculado.

* Estatística significativa em relação aos valores obtidos da infecção com a população total calculada pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Toxoplasma gondii é parasito protozoário intracelular obrigatório, agente causador da toxoplasmose (Sibley *et al.*, 2010). O sucesso da infecção por este parasito depende dos mecanismos de evasão contra a resposta imune do seu hospedeiro. No entanto, a população de parasitos tem que ser controlada de modo a evitar sua proliferação excessiva, assegurando a sobrevivência do hospedeiro e consequentemente do parasito. Tem sido relatado que a exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície de *L. amazonensis* é um dos principais mecanismos de inibição da resposta imune (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006), conceito conhecido como "mimetismo apoptótico" (Barcinski *et al.*, 2003; Wanderley *et al.*, 2006, 2010). Células em processo de apoptose expõem PS na face extracelular de sua membrana e, desta forma, sinalizam a inibição da resposta inflamatória de macrófagos (Fadok *et al.*, 1998; Kozmar *et al.*, 2010).

Nosso grupo tem demonstrado que em torno de metade da população total de *T. gondii* expõe PS na face externa de sua membrana (Seabra *et al.*, 2004). Na busca de melhor compreensão do comportamento da infecção originada pela subpopulação de *T. gondii* que expõe PS (PS+) e pela que não expõe (PS-), foram realizadas interações *in vitro* e infecções *in vivo* após o isolamento destas subpopulações.

Análise por citometria de fluxo assegurou a eficácia do método de isolamento das subpopulações. Observamos que houve redução no índice de infecção após interação das subpopulações isoladas dos parasitos com macrófagos residentes, em relação à infecção pela população total. Para entender melhor este resultado, foi realizada a análise desta interação por microscopia eletrônica de varredura e transmissão e microscopia óptica, na qual observamos que parasitos PS- estavam em vacúolos largos. Em contraste, parasitos PS+ estavam em vacúolos estreitos (membrana do vacúolo parasitóforo rente ao corpo do parasito).

Em interação realizada entre as subpopulações isoladas de *T. gondii* e linhagem celular não-fagocítica profissional, LLC-MK2, somente a população PS+ foi capaz de invadir as células, pois somente essa população foi encontrada em vacúolos estreitos.

Foi demonstrado que os taquizoítos de *T. gondii* que infectam células hospedeiras por penetração ativa são encontrados em vacúolos estreitos, enquanto

os que entram por fagocitose são encontrados em vacúolos largos (Morisaki *et al.*, 1995). Dynasore tem sido descrito como inibidor de dinamina (Kirchhausen *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2009). A dinamina é fundamental para a fusão e cisão de vesículas (Bajno *et al.*, 2000). Desta forma, é admissível que o Dynasore seja um potencial inibidor da fagocitose, já que a fusão de vesículas à membrana plasmática é crucial para a formação de pseudópodes que englobam o que está sendo fagocitado.

O uso de Dynasore durante a interação entre macrófagos ativados com as subpopulações PS+ e PS- reduziu consideravelmente a invasão de parasitos PS-. Além disso, o composto não foi capaz de inibir o mecanismo de penetração da subpopulação PS+, indicando que atuou apenas nos filamentos de actina das células hospedeiras.

Com estes resultados, concluímos que a população PS+ invade ativamente células hospedeiras, enquanto a população PS- depende de mecanismos endocíticos, como a fagocitose, para entrar em macrófagos.

Outro resultado interessante foi que o índice de infecção na interação utilizando-se a população total de parasitos foi maior, quando comparado ao índice obtido nas interações realizadas com as subpopulações isoladas. Este dado pode ser explicado pelo fato de que a população total de parasitos invade células através de dois mecanismos distintos: penetração ativa e fagocitose. Enquanto as subpopulações isoladas utilizam apenas um dos mecanismos. Assim, a infecção originada pela população total é mais eficiente do que a infecção gerada pelas subpopulações PS+ e PS-. Este resultado demonstrou, ainda, que somente os parasitos PS+ são capazes de se desenvolver em macrófagos ativados, visto que parasitos PS- penetram por fagocitose e, portanto, não inibem a atividade microbicida de macrófagos.

Foi descrito que 50% da população de taquizoítos são encontrados em macrófagos dentro de vacúolos largos (Jones *et al.*, 1972). Por outro lado, também tem sido relatado que 80% da população de taquizoítos que penetra em macrófagos encontram-se em vacúolos estreitos, e que 20% são encontrados em vacúolos largos (Morisaki *et al.*, 1995). Isto pode ser esclarecido pelo percentual de taquizoítas PS+ e PS- que compõem a população total. Em nosso modelo, a população PS+ varia de 50 a 80% da população total, o que explica a discrepância dos dados relatados acima.

A quantificação da produção de NO durante a interação com as subpopulações isoladas de taquizoítos de *T. gondii*, bem como com a população total de parasitos, mostrou que a população total e a subpopulação PS+ foram capazes de inibir a produção deste agente microbicida. Este resultado confirma a hipótese de que apenas os parasitos que expõem PS podem inibir a produção de NO pelos macrófagos (Seabra *et al.*, 2004), garantindo, assim, sua persistência. Evidentemente, é uma confirmação de que o mimetismo apoptótico é utilizado por essa cepa de *T. gondii*.

O teste *in vivo* foi realizado através da infecção de camundongos C57BL/6 com as subpopulações isoladas PS + e PS-, além da população total de *T. gondii*. Camundongos infectados com as subpopulações isoladas morreram mais rapidamente, em relação aos camundongos infectados com a população total de parasitos. Análise do fígado e baço dos camundongos infectados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão revelou que camundongos infectados pela subpopulação PS+ morreram por hiper parasitose, sugerindo que o sistema imune dos camundongos não foi capaz de conter a proliferação do parasito. Por outro lado, foi encontrado vasto infiltrado inflamatório nos camundongos infectados com a subpopulação PS-, indicando que o parasito não foi capaz de desempenhar atividade antimicrobicida, induzindo inflamação. Já nos camundongos infectados com a população total de parasitos, foram encontrados poucos parasitos e um pequeno infiltrado inflamatório. Este resultado sugere que a maior taxa de sobrevivência destes camundongos em relação aos infectados com as subpopulações isoladas PS+ e PS- foi devido ao equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a proliferação de *T. gondii*.

7. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a cepa RH de *T. gondii* pode se dividir em duas subpopulações com capacidades diferentes de exposição de PS. Estas subpopulações invadem células hospedeiras de duas maneiras diferentes, resultando em respostas finais completamente adversas: sobrevivência ou morte do parasito. Ambas as subpopulações são necessárias para manter um equilíbrio no hospedeiro entre morte e crescimento do parasito, assegurando a sobrevivência tanto de *T. gondii* quanto do hospedeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D.O., Hamilton, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol* (1984), 2: 283-318.
- Adams, D.O., Hamilton, T.A. Phagocytic cells: Cytotoxic activities of macrophages. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (1988), Raven Press, NY, pp 471-492.
- Adams, L.B., Hibbs, J.B., Taintor Jr, R.R., Krahenbuhl, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii* role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* (1990)144: 2725-2729.
- Allison, A.C., Davies, P., de Petris, S. Role of Contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nature (New Biol.)* (1971), 232: 153-160.
- Ambroise-Thomas, P., Pelloux, H. Toxoplasmosis congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today.* (1993) 2:61–63.
- Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., Courret, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* (1998) 6:392-401.
- Bahia-Oliveira, L.M., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C., Orefice, F., Adiss, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* (2003) 1: 55-62.
- Bajno L., Peng X.-R., Schreiber A.D., Moore H.-P., Trimble W.S., Grinstein, S. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J. Cell. Biol.* (2000), 149: 697–705.
- Balanco, J.M.F., Moreira, M.E.C., Bonomo, A.C., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pítmez, C., Barcinski, M.A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.* (2001), 11: 1870-1873.
- Barcinski, M.A., Moreira, M.E.C., Balanco, J.M.F., Wanderley, J.L.M., Bonomo, A.C. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetop. Biol. Dis.* (2003), 2: 6-7.

- Blader, I. J., Saeij, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*. (2009), 117: 458–476.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., Joiner, K.A. 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.* (1994) 127: 947-961.
- Bermudez, L.E., Covaro, G., Remington, J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect. Immun.* (1993) 61: 4126-4130
- Brossier, F., Jewett, T.J., Lovet, J.L., Sibley, L.D. C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J. Biol. Chem.*(2003) 278: 6229-6234.
- Caldas, L.A., Attias, M., de Souza, W. Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS. Microbiol. Lett.* (2009), 301: 103–108.
- Cantos, G.A., Prando, M.D., Siqueira, M.V., Teixeira, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos *antitoxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev. Assoc. Med. Bras.* (2000) 46:4
- Carruthers, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* *Acta. Trop.* (2002), 81: 111–122.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*(1997) 73: 114-123.
- Carvalho, T.U., De Souza, W. Study of mitochondrial organization in living resident and activated macrophages using the laser dye rhodamine 123. *J. Leuk. Biol.* (1989), 45: 498-502.
- Clark, M.R. Flippin' lipids. *Nature Immunology* (2011), 12: 373-375.
- Dal-Pizzol, Felipe, M.D. Alternative activated macrophage: A new key for systemic inflammatory response syndrome and sepsis treatment? *Critical Care Medicine.* (2004) 32:1971-1972.
- DaMatta, R.A., Seabra, S.H., Deolindo, P., Arnholdt, A.C.V., Manhaes, L.D.S., Goldenberg, S., De Souza, W. Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiology Letters* (2007), 266: 29-33.

- Dannemann, B., Mccutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann. Intern. Med.* (1992) 116: 33-43.
- De Souza, W., Benchimol, M. - The cytoskeleton of resident peritoneal mouse macrophages. *Microsc. Electr. Biol. Cel.* (1985), 9: 177-191.
- De Souza, W., Campanati, L., Attias, M. Strategies and results of field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) in the study of parasitic protozoa. *Micron* (2008), 39: 77–87.
- Donnelly, E.T., O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S.E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum. Reprod.* (2000) 15: 1552–1561.
- Dressen, D.W. *Toxoplasma gondii*. *J. Am. Vet. Assoc.* (1990) 196: 274-276.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K.A. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* (1993) 79 402-408.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* (1998) 28: 1007-1013.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* (1999) 68: 383-424.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M. (1998), Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* (1998), 101: 890–898.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Henson P.M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* (2001), 108: 957–962.
- Ferguson, D.J.. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2009) 104: 133-148.
- Fernandes, P. D., Araujo, H. M., Riveros-Moreno, V., Assreuy, J., Depolymerization of macrophage microfilaments prevents induction and inhibits activity of nitric oxide synthase. *Eur. J. Cell. Biol.* (1996), 71: 356-362.

- Ferreira, M.S., Borges, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2002) 4: 443-457.
- Finlay, B.B., Cossart, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* (1997) 276: 718-725.
- Frenkel, J.K. Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. In *The Coccidia*. University Park Press. (1973), 343-410.
- Frenkel, J.K., Hitchings, G.H. Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic, folic and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on *Toxoplasma*, mouse and man. *Antibiot Chemother* (1957) 7: 630-638,.
- Frenkel, J.K. Toxoplasmosis in human beings. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (1990), 196: 240-248.
- Frey, B., Gaipf, U. The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Seminars in Immunopathology.* (2011), 33: 497-516.
- Garin, J.P., Eyles, D.E. Le traitement de la toxoplasmose expérimentale de la souris par La spiramycine. *La Presse Médicale.* (1958) 66:957-958.
- Gordon, S. Alternative Activation of Macrophages. *Nature Reviews Immunology.* (2003) 3: 23-35.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skippel, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. *Anal. Biochem.* (1982) 126: 131-138.
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., Sever, S. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* (2010) 29: 3593-3606.
- Guillermo, L.V.C., DaMatta, R.A. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poultry Science* (2004), 83: 776-782.
- Haverkos, H.W. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE Study Group. *Am. J. Med.* (1987) 82:907-914.
- Huynh, M.L., Fadok, V.A., Henson, P.M. Phosphatidylserine dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* (2002) 109: 41-50.
- Ian, C. - The macrophage. A review of ultrastructure and function. Academic Press. London/New York. (1973), p11.

- Joiner, K.A., Dubremetz, J.F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.* (1993), 61: 1169-1172.
- Jones, T.C., Yeh, S., Hirsch, J.G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* (1972), 136: 1157-1172.
- Katlama, C., De Wit, S., O'doherty, E., Van Glabeke, M., Clumeck, N. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* (1996) 22: 268-275.
- Keklikoglu, N., Koray, M., Kocaelli, H., Akinci, S. iNOS Expression in Oral and Gastrointestinal Tract Mucosa. *Dig. Dis. Sci.* (2008), 53: 1437–1442.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* (1972) 26: 239–257.
- Kirchhausen, T., Macia, E., Pelish, H.E. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Method. Enzymol.* (2008) 438: 77-93.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. Van Oers, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* (1994) 84: 1415–1420.
- Kozmar, A., Greenlee-Wacker, M.C., Bohlon, S.S. Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. *J. Innate. Immun.* (2010), 2: 248-259.
- Lüder, C.G., Aligner, M., Lang, C., Bleicher, N., Gross, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* (2003), 33: 833–844.
- Lyons, R.E., Johnson, A.M. Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* (1995), 17: 353-359.
- McDonald, P. P., Fadok, V. A., Bratton, D. and Henson, P. M. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J. Immunol.* (1999) 163: 6164-6272.

- Magno, R., Lemgruber, L., Vommaro, R.C., De Souza, W., Attias, M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* (2005) 67: 45-52.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library* (2008), 13: 453-61.
- Mercier, C., Dubremetz, J.F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L.D., Cebron Delauw, M.F. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell* (2002) 13: 2397-2409.
- Mercier, C., Adjogble, K.D., Daubener, W., Delauw, M.F. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexas parasites? *Int. J. Parasitol.* (2005) 35: 829-849.
- Mercier, J., Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* (2008), 320: 531-535.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* (2004), 12: 1965–1976.
- Mordue, D.G., Sibley, L.D. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* (1997) 159:4452-4459.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M., Sibley, L.D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* (1999) 190: 1783-1792.
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E., Sibley, L.D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Science* (1995), 108: 2457-2464.
- Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J. R., Jansen, P. L. M. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.* (1995), 41: 892-896.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* (2008), 8: 958-969.
- Niel, G., Videau, D. Activite de la spiramycione in vitro sur *Toxoplasma gondii*. *Reunion Inter Discipl. Chimioth. Antiinfect.* (1981) 121-128.
- Praefcke, G.J.K., McMahon, H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2004), 5: 133–147.

- Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., E Jerome, M., Roos, D.S., White, M.W., Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. (2001) 115: 165-175.
- Rozenfeld, C., Martinez, R., Seabra, S.H., Sant'anna, C., Gonçalves, J.G.R., Bozza, M., Moura-Neto, V., De Souza, W. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. *Am. J. Pathol.* (2005), 167: 1021–1031.
- Santos, A.B., De Souza, W. Surface charge and ultrastructure of the cell surface of resident and thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages. *Journal of Submicroscopic Cytology* (1983), 15: 897-911.
- Santos, J.M., Lebrun, M., Daher, W., Soldati, D., Dubremetz, J.F. Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *Int. J. Parasitol.* (2009) 39:153-162.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J.M., Joiner, K.A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91: 509-513.
- Seabra, S.H., De Souza, W., DaMatta, R.A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. *Exp. Parasitol.* (2002), 100: 62-70.
- Seabra, S.H., De Souza W., DaMatta R.A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004), 324: 744–752.
- Shenoy, A.R., Bae-Hoon, K., Han-Pil C., Matsuzawa, T., Tiwari, S., MacMicking, J.D. Emerging themes in IFN- γ -induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology.* (2008) 212: 771-784.
- Sibley, L.D., Weidner, E., Krahenbuhl, J.L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* (1985) 315: 416-419.
- Sibley, L.D., Andrews, N.W. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic.* (2000) 1: 100-106.
- Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii*: Perfecting an intracellular life style. *Traffic.* (2003) 4: 581-586.

- Sibley, L.D., Khan, A., Ajioka, J.W. and Rosenthal. B.M. Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (2010), 364: 2749-2761.
- Souza, W., DaMatta, R.A., Attias, M. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (2009), 104: 149-154.
- Stuehr, D.J., Marletta, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or Interferon- γ . *J. Immunol.* (1987), 139: 518-525.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R., Remington, J. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* (1988) 240: 516
- Takahashi, H., Yasuhiro, T., Takeuchi, D., Kobayashi, M., Herndon, D.N., Suzuki, F. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Crit. Care Med.* (2004) 32: 1879-1885.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* (2000), 30: 1217-1258.
- Tripathi, A., Gupta, C.M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2003), 128: 1-9.
- Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L. The Mononuclear Phagocyte System: a new classification of macrophages, monocytes and their precursors cell. *Bull. Wld. Hlth. Org.* (1972), 46: 845-852.
- Vodovotz, Y., Russell, D., Xie, Q.W., Bogdan, C., Nathan, C. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J. Immunol.* (1995), 154: 2914-2925.
- Wanderley, J.L., Moreira, M.E., Benjamin, A., Bonomo, A.C., Barcinski, M.A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J. Immunol.* (2006), 176: 1834-1839.
- Wanderley, J.L., Barcinski, M.A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cellular and Molecular Life Sciences.* (2010), 67: 1653-1659.
- Weiss, L.M., Kim, K. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. *Perspectives and Methods.* Academic Press. (2007) 1: 800.
- Wong, S.Y., Remington, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* (1993), 7: 299-316.

- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D.C.S., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., Takeda, K., A Cluster of Interferon- γ -Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against *Toxoplasma gondii*, Immunity. (2012) 37:302-313.
- Yona, Simon; Jung, Steffen. Monocytes: subsets, origins, fates and functions Curr. Opin. Hematol. (2010), 17: 53-59.

9. ANEXO – ARTIGO PUBLICADO

Phosphatidylserine Exposure by *Toxoplasma gondii* Is Fundamental to Balance the Immune Response Granting Survival of the Parasite and of the Host

Thiago Alves Teixeira dos Santos^{1,2}, Juliana de Araújo Portes^{1,3}, João Claudio Damasceno-Sá², Lucio Ayres Caldas³, Wanderley de Souza³, Renato Augusto DaMatta², Sergio Henrique Seabra^{1*}

1 Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia (LTBM), Colegiado de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Brazil, **3** Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Phosphatidylserine (PS) exposure on the cell surface indicates apoptosis, but has also been related to evasion mechanisms of parasites, a concept known as apoptotic mimicry. *Toxoplasma gondii* mimics apoptotic cells by exposing PS, inducing secretion of TGF-β1 by infected activated macrophages leading to degradation of inducible nitric oxide (NO) synthase, NO production inhibition and consequently persisting in these cells. Here PS⁺ and PS⁻ subpopulation of tachyzoites were separated and the entrance mechanism, growth and NO inhibition in murine macrophages, and mice survival and pathology were analyzed. Infection index in resident macrophages was similar for both PS subpopulations but lower when compared to the total *T. gondii* population. Growth in resident macrophages was higher for the total *T. gondii* population, intermediate for the PS⁺ and lower for the PS⁻ subpopulation. Production of NO by activated macrophages was inhibited after infection with the PS⁺ subpopulation and the total populations of tachyzoites. However, the PS⁻ subpopulation was not able to inhibit NO production. PS⁺ subpopulation invaded macrophages by active penetration as indicated by tight-fitting vacuoles, but the PS⁻ subpopulation entered macrophages by phagocytosis as suggested by loose-fitting vacuoles containing these tachyzoites. The entrance mechanism of both subpopulations was confirmed in a non-professional phagocytic cell line where only the PS⁺ tachyzoites were found inside these cells in tight-fitting vacuoles. Both subpopulations of *T. gondii* killed mice faster than the total population. Clear signs of inflammation and no tachyzoites were seen in the peritoneal cavity of mice infected with the PS⁻ subpopulation. Moreover, mice infected with the PS⁺ subpopulation had no sign of inflammation and the parasite burden was intense. These results show that PS⁺ and PS⁻ subpopulations of *T. gondii* are necessary for a successful toxoplasma infection indicating that both subpopulations are required to maintain the balance between inflammation and parasite growth.

Citation: dos Santos TAT, Portes JdA, Damasceno-Sá JC, Caldas LA, de Souza W, et al. (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. doi:10.1371/journal.pone.0027867

Editor: Emmanuel Dias-Neto, AC Camargo Cancer Hospital, Brazil

Received: July 7, 2011; **Accepted:** October 26, 2011; **Published:** November 29, 2011

Copyright: © 2011 dos Santos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by FAPERJ (Research Support Foundation of Rio de Janeiro) and CNPQ (National Research Council of Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: seabra@pq.cnpq.br

Introduction

Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan [1]. This parasite has a worldwide distribution, in a broad host range, and is considered one of the most successful on earth [1,2]. Although up to one third of the world human population is infected with *T. gondii* [3], most infections are asymptomatic, but severe clinical manifestations can arise in immunocompromised individuals [1].

Although NO production by activated macrophages controls *T. gondii* proliferation [4–7], the parasite regulates NO production and can persist in activated macrophages [4,5,7–9]. Our group has showed that approximately 50% of the total population of *T. gondii* exposes phosphatidylserine (PS) on their outer leaflet of the plasma membrane, this mechanism is involved in the inhibition of NO production of infected activated macrophages [4]. Inhibition of NO allows *T. gondii* to persist in infected macrophages [4,5,7–9]. A

reduced expression of inducible NO synthase [4,5,7,8] and disappearance of nuclear factor kappa B (NF-κB) from the nucleus of activated *T. gondii* infected macrophages occurs in a Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-β1) dependent way [4]. However, the molecular mechanism that controls these evasion processes is not well known.

PS is a phospholipid present at the plasma membrane, which is a major ligand involved in the uptake of apoptotic cells [10]. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces a noninflammatory response based on the exposure of PS [11] that leads to TGF-β1 secretion [11,12]. Due to this property, PS has been related to the evasion mechanism of *Leishmania amazonensis* from macrophages, a concept known as “apoptotic mimicry” [13,14]. It was demonstrated that this protozoan exposes PS and this is involved in the internalization process, causing alternative activation of macrophage through the induction of TGF-β1 secretion, interleukin (IL)-10 synthesis, and inhibition of NO

production [15,16]. Similarly, trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* exposes PS reducing iNOS expression after infection of activated macrophages [17]. Apoptotic mimicry has also been implicated in the entrance of the vaccinia virus into host cells [18].

The mechanism of *T. gondii* invasion involves the formation of a moving junction between the parasite and the host cell plasma membrane. The plasma membrane invaginates concomitantly with the formation of the parasitophorous vacuole. This process is known as active invasion [19]. However, the entrance of tachyzoites can also occur by an internalization pathway that involves the host cell [19,20], as recently indicated in a study using dynasore [21], an inhibitor of the endocytic pathway [22].

Here we showed the immunopathological mechanisms behind the interaction of isolated PS⁺ and PS⁻ subpopulation of *T. gondii* with host cells. Morphological analyses of their interactions with dynasore showed that PS⁺ parasites invaded macrophages by active penetration, while PS⁻ parasites entered by phagocytosis. Only the PS⁺ subpopulation of *T. gondii* was able to inhibit NO of activated macrophages. A non-professional phagocytic cell line was actively invaded by the PS⁺ subpopulation, but no tachyzoites were internalized in this cell line when the PS⁻ subpopulation was used. Furthermore, infected mice with the separated subpopulations were killed faster than the ones infected with the total population. High levels of inflammation were found in mice infected with the PS⁻ subpopulation, and increased parasite burden was present in mice infected with the PS⁺ subpopulation, explaining the low survival of mice infected with both subpopulations. Collectively, these results indicate that the escape mechanism of *T. gondii* is dependent on the exposure of PS and suggests that both subpopulations of *T. gondii* are necessary for a successful infection and survival.

Results

1. The isolation method to obtain PS⁺ and PS⁻ subpopulations was efficient

The isolation method of the PS⁺ and PS⁻ tachyzoite subpopulation was assayed by flow cytometer. This analysis showed a clear shift to the right of the histogram indicating that the isolated PS⁺ subpopulation was exposing high levels of PS (Figure 1A). A 96% purity was obtained for the PS⁺ subpopulation. In addition, the isolated PS⁻ subpopulation did not stain with annexin V (Figure 1B); a 98% purity was obtained.

2. The PS⁻ subpopulation of tachyzoite entered macrophages through phagocytosis and only the PS⁺ subpopulation inhibited NO of activated macrophages

Both isolated PS subpopulations were less capable of infecting resident macrophages after 1 h when compared to the total *T. gondii* population (Figure 2A and 2B). However, the PS⁺ subpopulation was better able to grow in resident macrophages after 24 and 48 h when compared to the PS⁻ subpopulation (Figure 2B). To further understand the entrance mechanism of both PS subpopulations in resident macrophages, dynasore was used before and during the interaction. The entrance capacity of the PS⁺ subpopulation did not vary with increasing concentrations of dynasore (Figure 2C); however, the entrance capacity of the PS⁻ subpopulation lowered with higher dynasore concentrations (Figure 2D). Moreover, only the PS⁺ subpopulation was able to inhibit NO production after 24 and 48 h of infection of activated macrophages (Figure 2E). As demonstrated before, the total population inhibited NO production like the PS⁺ subpopulation (not shown). Furthermore, the amount of nitrite measured in the supernatant of activated macrophages that interacted with the

PS⁻ subpopulation was statistically equal to the amount produced by noninfected activated macrophages (Figure 2E).

3. PS⁻ tachyzoites were in loose-fitting vacuoles while the PS⁺ were in tight-fitting vacuoles

Loose-fitting vacuoles observed after the interaction of macrophages with the PS⁻ subpopulation (Figures 3A, 3C, 3E and 4A) are regarded as an indicator of phagocytosis as the entrance mechanism of tachyzoites [19]. Interaction of macrophages with the PS⁺ subpopulation resulted in tight-fitting vacuoles (Figures 3B, 3D, 3F and 4B), indicating that active penetration [19] was the main entrance mechanism in macrophages for this subpopulation. Tight and loose-fitting vacuoles were counted by light microscopy and interactions with the PS⁻ subpopulations resulted in about 76% of loose-fitting vacuoles and the PS⁺ subpopulation in 78% of tight-fitting vacuoles.

Analysis by transmission electron microscopy of the interaction between the non-professional phagocytic LLC-MK2 and isolated subpopulations of *T. gondii* showed that the PS⁻ parasites could not infect the host cells (Figure 4C). However, the PS⁺ parasites were able to invade this cell lineage (Figure 4D) by active penetration as judged by the tight-fitting vacuole.

4. Both PS subpopulations were able to kill mice faster than the total population

Mice infected with PS⁺ or PS⁻ subpopulations of *T. gondii* had a mean survival time of 5 days, while mice infected with the total population of parasites had a mean survival time of 7 days (Figure 5A). Immediately following the death of the mice, spleen and liver were collected for pathological analysis. Leukocytes of the inflammatory infiltrate and parasites were counted and cell numbers in tissues of mice infected with the PS subpopulations were compared to the numbers found in tissue of mice infected with the total population. Macrophages and lymphocytes were the only leukocyte types seen and the former the only one with significant differences between the infections. Spleens infected with the PS⁺ subpopulation presented a significant reduction (2.75 fold) in the number of macrophages and a significant increase (2.20 fold) of tachyzoites (5B2 and 5B3). The infection with the PS⁻ subpopulation resulted in a significant increase of macrophages (1.91 fold) in relation to the infection with the total population (5B1 and 5B3). In livers, the infection with the PS⁺ subpopulation decreased significantly the number of macrophages (3.00 fold) and increased significantly the number of tachyzoites (2.67 fold) (5B5 and 5B6). The infection with the PS⁻ subpopulation increased significantly the number of macrophage (1.91 fold) and decreased significantly the number of tachyzoites (2.00 fold) (5 B4 and 5B6).

Discussion

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasitic protozoan that causes toxoplasmosis. The success of the infection by this parasite depends on the evasion mechanisms against the host's immune response. However, the parasite population must be controlled to avoid host death, ensuring parasite survival and subsequent passage to the next generation of the host. The balance between parasite evasion mechanism and host control of the parasite is not understood. In studies with *L. amazonensis* it has been reported that exposure of PS on the surface of the parasites is one of the main mechanisms of inhibition of the immune response [15,16]; leading to the concept of "apoptotic mimicry" [13,14]. When a cell initiates the apoptotic process, PS on the outer extracellular leaflet of the plasma membrane signals the inhibition of the inflammatory response of macrophages [11,23]. In the quest

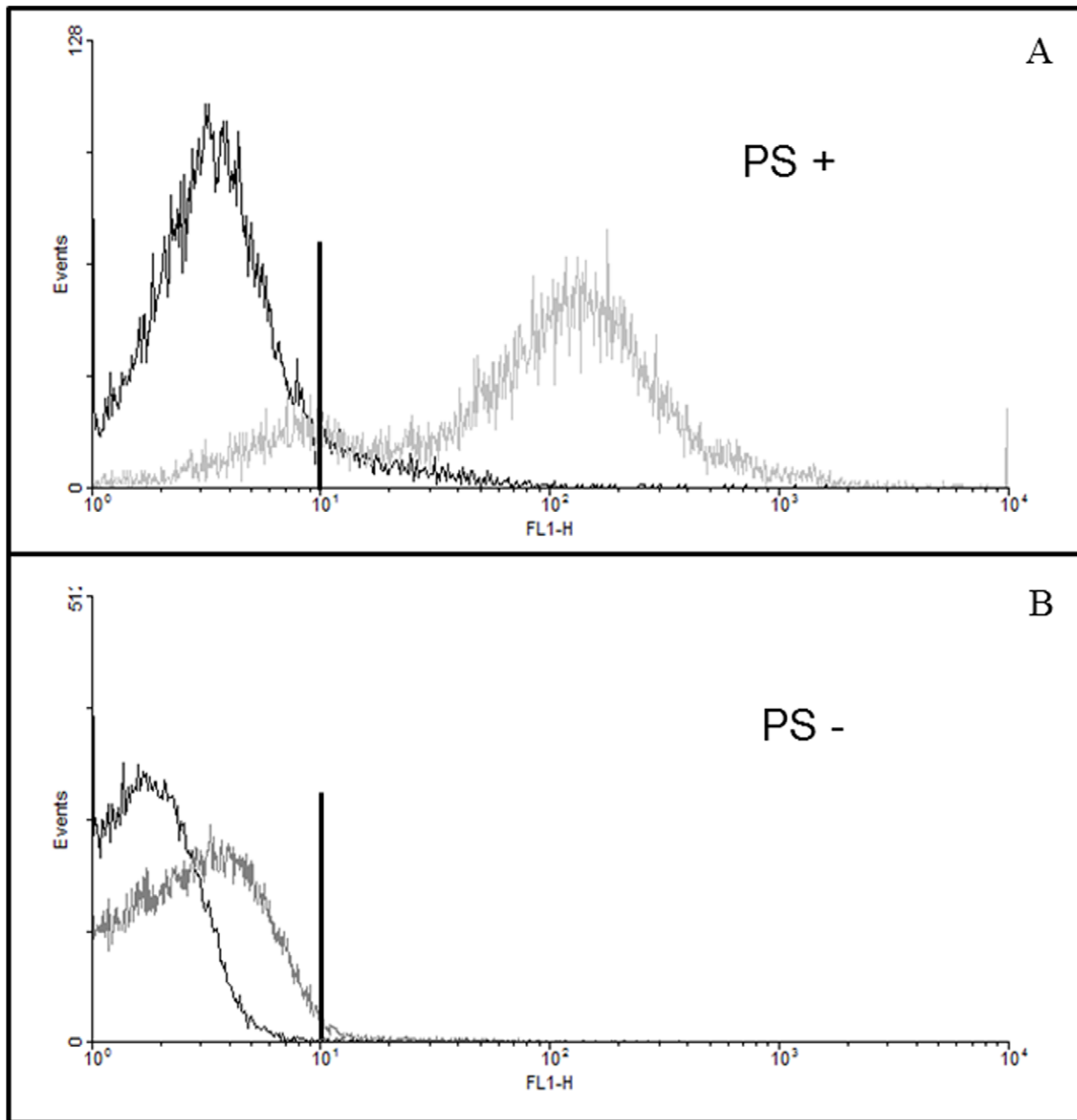


Figure 1. Phosphatidylserine (PS)⁺ and PS⁻ subpopulations of *Toxoplasma gondii* were magnetically separated and analyzed by flow cytometry after annexin-V staining. (A) PS⁺ subpopulation of *T. gondii*. (B) PS⁻ subpopulation of *T. gondii*. The black lines represent control parasites without Annexin - V and the gray lines refer to the isolated subpopulations. Results from one representative experiment out of five. doi:10.1371/journal.pone.0027867.g001

to better understand the behavior of the infection caused by the PS⁺ and PS⁻ subpopulations of *T. gondii*, interactions were performed *in vitro* and *in vivo* after the isolation of these subpopulations by magnetic separation. Flow cytometry assured the efficacy of PS subpopulations isolation.

A reduced infection index in resident macrophages was observed when both PS subpopulations were used to infect these cells compared to the total *T. gondii* population. To better understand this result, analyses of the size of the vacuoles containing tachyzoites were performed by light, scanning and transmission electron microscopy, through which we could observe that PS⁻ parasites were inside loose-fitting vacuoles and

PS⁺ parasites inside tight-fitting vacuoles. In addition, interaction between isolated subpopulations and the non-professional phagocytic cell line, LLC-MK2, showed that only PS⁺ parasites were internalized. It has been demonstrated that tachyzoites that infect the host cells by active penetration end up in tight-fitting vacuole, whereas the ones that enter through phagocytosis are found in loose-fitting vacuole [19]. Thus, our results indicate that PS⁻ subpopulation enter macrophages through a phagocytic mechanism. On the other hand, the PS⁺ subpopulation was found in macrophages and in the LLC-MK2 cell line in tight-fitting vacuoles. Because this type of vacuoles is an indicator of active penetration [19], it is reasonable to conclude that only the PS⁺

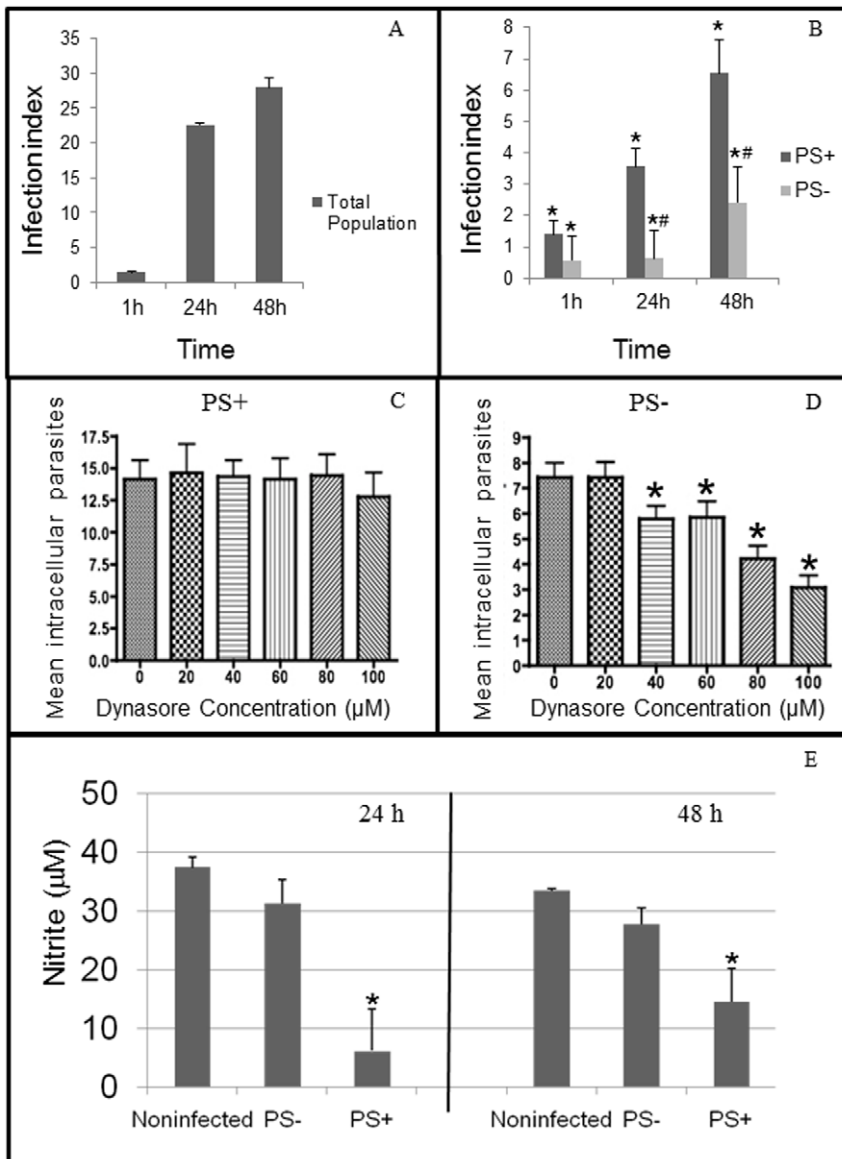


Figure 2. Interaction of *Toxoplasma gondii* total population, PS⁺ or PS⁻ subpopulations of tachyzoites with resident (A, B, C, D) or activated (E) macrophages. (A) Infection index of resident macrophage after interaction with total population. (B) Infection index of resident macrophage after interaction with PS⁺ or PS⁻ *T. gondii* subpopulations. *Significant difference from total population ($p \leq 0.05$) by variance analysis (ANOVA). #Significant difference from the PS⁺ subpopulation ($p \leq 0.05$) by variance analysis (ANOVA). (C–D) Infection index of resident macrophage that interacted with PS⁺ (C) or PS⁻ (D) *T. gondii* subpopulation in the presence of dynasore. *Significant difference from the untreated samples ($p \leq 0.05$) by variance analysis (ANOVA). (E) Nitric oxide production of noninfected activated macrophages or after interaction with PS⁺ or PS⁻ subpopulations of *T. gondii*. *Significant difference from the noninfected values ($p \leq 0.05$) by the Student *t* test. Results are from at least three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0027867.g002

tachyzoite were able to use this entrance mechanism to invade host cells. Furthermore, this difference in entrance mechanism between both PS subpopulations and the fact that the LLC-MK2 cell line is not a professional phagocyte, explains why PS⁻ tachyzoites were not found inside this cell line.

Dynasore has been described as an inhibitor of the endocytic pathway because it inhibits dynamin [22]. Dynamin has recently been implicated in actin dynamics [24], thus, its use can alter all cell processes that involve this cytoskeleton filament, including phagocytosis. Moreover, phagocytosis also depends on the fusion of endomembrane compartments to the plasma membrane to form the phagosome, a process known as “focal exocytosis” [25].

Because dynamin is necessary for the fusion and scission of vesicles [26], it is sound to infer that dynasore is a potential inhibitor of phagocytosis. The use of dynasore reduced the entrance of the PS⁻ subpopulation, but no alteration was found when the PS⁺ subpopulation was treated. This corroborates with phagocytosis as the internalization mechanism in macrophages by the PS⁻ subpopulation. Furthermore, this compound was not able to inhibit the active penetration mechanism of PS⁺ subpopulation indicating that dynasore only worked at host cell actin filaments.

Another interesting datum was that the infection index in resident macrophages was higher for the total population when compared to both PS subpopulations. This result can be explained

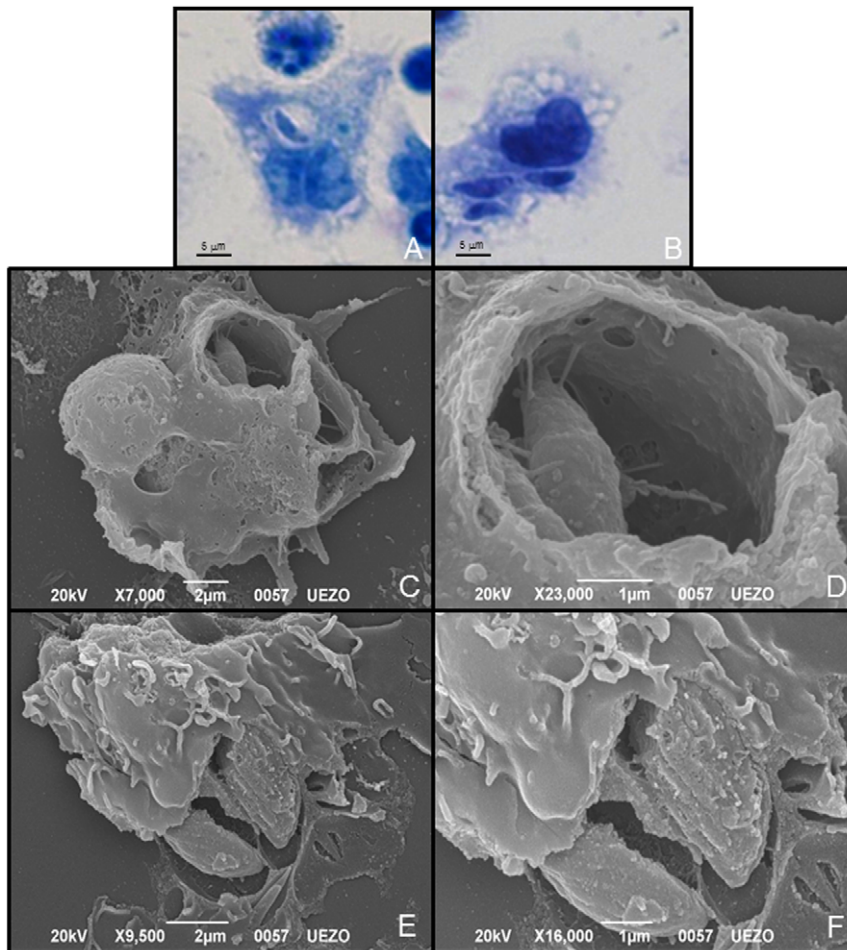


Figure 3. Light and scanning electron microscopy of macrophage vacuoles with phosphatidylserine (PS)⁺ and PS⁻ tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. (A), (C) and (E) Macrophage vacuoles after interaction with PS⁻ subpopulation of *T. gondii*. Note the loose-fitting vacuole around the parasite caused by phagocytosis entrance. (B), (D) and (F) Macrophage vacuoles after interaction with PS⁺ subpopulation of *T. gondii*. Note the tight-fitting vacuoles around the parasite, indicating active penetration. Results are from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0027867.g003

by the fact that PS⁺ and PS⁻ subpopulations entered macrophages by active penetration or phagocytosis, respectively. Because the total population was a combination of both subpopulations that enter through two distinct mechanisms, the infection index for the total population was higher compared to each PS subpopulations, which enter by one or the other mechanism. The infection index in resident macrophages was higher for the PS⁺ subpopulation than for PS⁻ parasites. This result indicates that only PS⁺ tachyzoites are capable of developing in resident macrophages. Because the PS⁻ subpopulation enters macrophages through phagocytosis, this may lead to more effective killing mechanisms, suppression of growth and lower infection index.

It has been reported that 50% of the tachyzoite population are found in macrophages in loose-fitting vacuoles [20]. On the other hand, it has also been reported that 80% of the tachyzoite population that enter macrophages are found in tight-fitting vacuoles and 20% in loose-fitting vacuoles [19]. This might be explained by the percentage of the PS⁺ tachyzoite that composes the population. In our model, the PS⁺ subpopulation varies from 50 to 80% of the total population (unpublished results). All together the datum indicates that PS exposure may be important to trigger the active penetration process. Nevertheless, further

studies are necessary to better understand the consequences of PS exposure on parasite-host cell interactions.

Quantification of NO production during interaction with isolated tachyzoite subpopulations, as well as with the total population of *T. gondii*, showed that only the total and the PS⁺ subpopulation were able to inhibit the production of this microbicidal agent, whereas PS⁻ subpopulation was not able to inhibit NO production in activated macrophages. These results confirm the hypothesis that only parasites that expose PS can inhibit NO production by macrophages [4]. Thus, only these tachyzoites are able to escape this microbicidal system ensuring the persistence of *T. gondii* in activated macrophages. This is a clear confirmation that apoptotic mimicry is used by *T. gondii* [4,27].

Infection of mice with both subpopulations and the total population of *T. gondii* showed that both isolated subpopulations caused an early death compared to mice infected with the total population. Light and transmission electron microscopy of liver and spleen of infected mice revealed that mice infected by the PS⁺ subpopulation died through hyper parasitemia, indicating that the immune system of these mice was not able to contain and control the proliferation of this subpopulation. On the other hand, mice infected with the PS⁻ subpopulation died of a high inflammatory

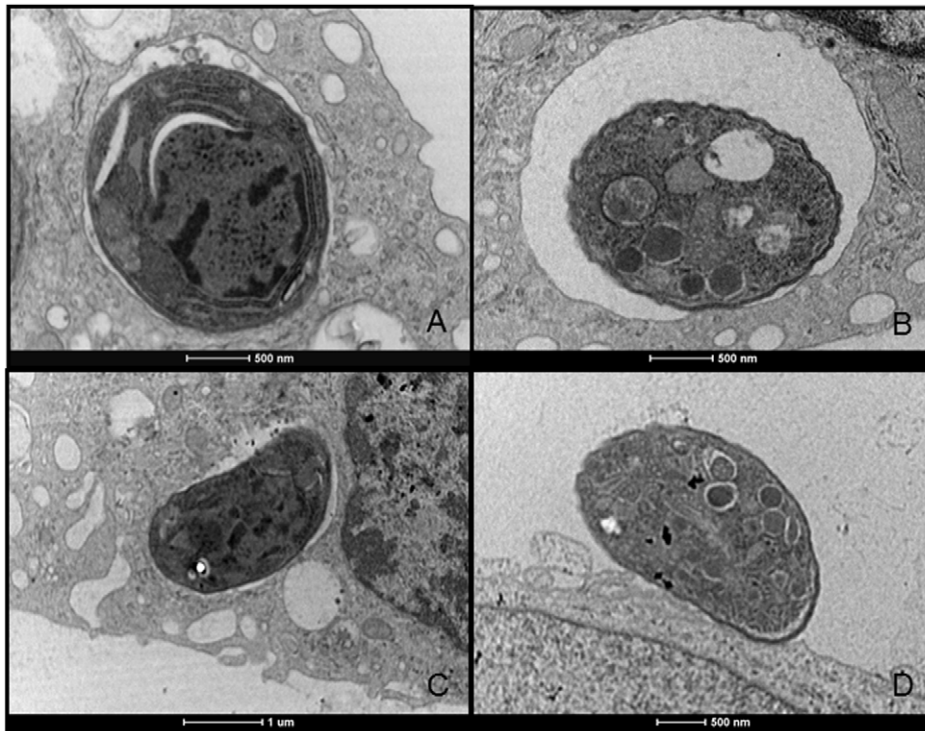


Figure 4. Transmission electron microscopy of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* after interactions with macrophages or the non-phagocytic cell line LLC-MK2. (A) Interaction of macrophages with PS⁻ subpopulation of *T. gondii*. (B) Interaction of macrophages with PS⁺ subpopulation of *T. gondii*. (C) Interaction of LLC-MK2 with PS⁻ subpopulation of *T. gondii*. (D) Interaction of LLC-MK2 with PS⁺ subpopulation of *T. gondii*. Note tight-fitting vacuoles after interaction of host cells with PS⁺ tachyzoites; PS⁻ tachyzoites were not able to enter LLC-MK2 cells and were found in loose-fitting vacuoles after interaction with macrophages. Results are from two independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0027867.g004

process probably generated by their immune systems as a response against this subpopulation of tachyzoites. This is likely to happen because PS⁻ tachyzoites were not capable of inhibiting the antiparasitic activity caused by NO, inducing a higher inflammatory response not balanced by the PS⁺ subpopulation. The examined liver and spleen of mice infected with the total population of *T. gondii* revealed the presence of mild parasitosis and inflammatory infiltrate, suggesting that the higher survival rate of these mice compared with the ones infected with separated PS subpopulations was due to an equilibrium between the host immune response and the proliferation of the *T. gondii*.

In conclusion, *T. gondii* of the RH strain can be divided into two subpopulations with different PS exposure capacities. These subpopulations gain access to macrophages in two distinct manners resulting in completely different final outcomes: survival or death of the parasite. Both subpopulations may be necessary to maintain a balance in the host between parasite death and growth. This balance may be achieved by the different PS subpopulations assuring parasite and host survival resulting in an evident advantage to the RH strain of *T. gondii*.

Materials and Methods

1. Peritoneal macrophages and LLC-MK2

Peritoneal macrophages were obtained by peritoneal washing of Swiss mice with Hank's solution [5]. Macrophages were plated over glass coverslips in 24-well plates. After 1 h of adherence at 37°C, cells were washed with Hank's solution and cultured with DMEM containing 5% FBS at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. LLC-MK2 (ATCC number CCL-7TM) was maintained in 25 cm²

cell culture flasks bottles with DMEM containing 10% FBS. Cells were infected with the separated PS subpopulations of tachyzoites (see item 4) and fixed for transmission electron microscopy (item 11).

2. Ethics Statement

This study was carried out in strict accordance with the Brazilian Law #11794/08. The animal studies protocol was reviewed and approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Estadual do Norte Fluminense (Permit Number: 98).

3. Tachyzoites of *Toxoplasma gondii*

Tachyzoites of *T. gondii* (RH strain) were maintained by inoculation into the peritoneal cavity of mice every 2 or 3 days [5]. After this period, a wash of the peritoneal cavity was performed with Hank's solution followed by centrifugation at 100 g for 5 min. The collected supernatant was centrifuged at 1000 g for 10 min. Parasites were resuspended in DMEM and counted in a Neubauer chamber.

4. Isolation of PS⁺ and PS⁻ subpopulations

Parasites were collected from infected mice as described above and 2×10⁸ tachyzoites were incubated with annexin V conjugated to magnetic microspheres (Miltenyi Biotec). After 40 min, the cell suspension was added to a magnetic column, retaining only the PS⁺ parasites; PS⁻ parasites were eluted, collected and saved. PS⁺ parasites were removed from the column using standard manufacturer's instructions.

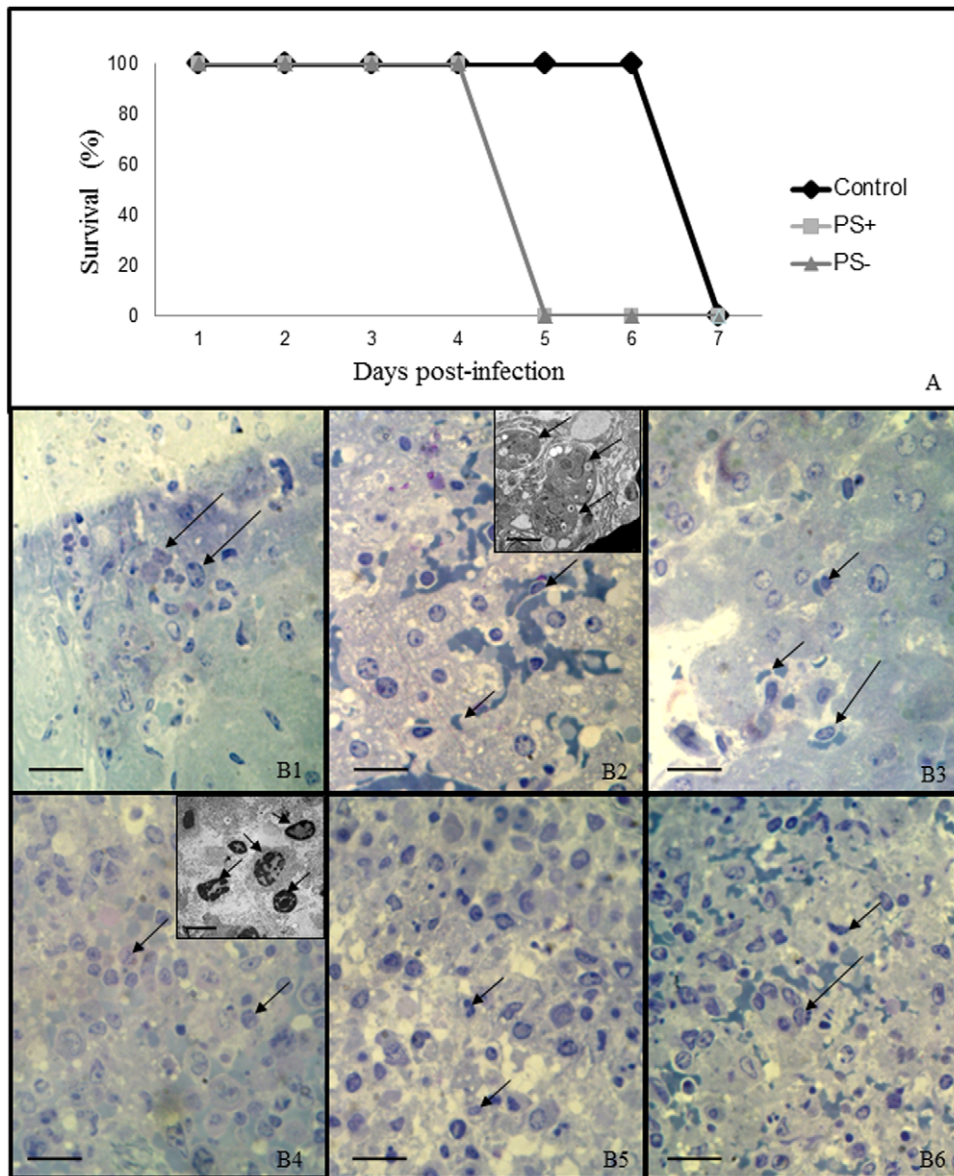


Figure 5. Analysis of *Toxoplasma gondii* infection in vivo. C57/BL6 mice were infected with PS⁺, PS⁻ subpopulations or the total population of *T. gondii*. (A) Survival curve of mice after the infection with *T. gondii*. Kaplan Meier analysis $p = 0.0273$. (B) Light microscopy of spleen and liver tissue of C57/BL6 mice after interaction with PS⁺ or PS⁻ subpopulation of *T. gondii*. Bars = 100 μm . (B1–3) Spleen images after interaction with the PS⁻ (B1), PS⁺ (B2) or the total population of *T. gondii* (B3). Note the presence of inflammatory cells in B1 (arrows) and the presence of parasites in B2 and B3 (arrows). (B4–6) Liver images after interaction with PS⁻ (B4), PS⁺ (B5) or the total population of *T. gondii* (B6). Note similar results obtained for the spleen tissue. Inset – Transmission electron microscopy: B2, Bar = 2 μm ; B4, Bar = 16 μm . Results are from two independent experiments with 6 animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0027867.g005

5. Flow cytometry analysis of the subpopulations separation method

After magnetic separation, PS⁺, PS⁻ subpopulations of *T. gondii* and the unseparated total population were incubated with annexin-V - alexa 488 and propidium iodide for 1 h [4]. After incubation, parasites were analyzed in a flow cytometer BD Xcalibur. The analyses on histogram were performed in the WinMDI 2.9 program for PC.

6. Activation of peritoneal macrophages and interaction with parasites

Interactions were performed with non-activated (resident) and macrophages activated for 24 h right after adherence. Activation

was performed with 50 U/ml of murine recombinant interferon- γ (IFN- γ , Sigma) and 100 ng/ml of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (0111:B4 LPS, Sigma). The cells were washed and either PS⁻, PS⁺ or the total population of tachyzoites was added with a ratio of 10 parasites to 1 macrophage for 1 and 24 h. In some experiments macrophages were incubated with crescent μM concentrations of dynasore for 1 h before and during the interaction [21].

7. Sample preparation for morphological analysis and determination of the index of infection

After methanol fixation, cells were washed, stained with Giemsa (diluted 10 \times in distilled water), dehydrated in a series of acetone-xylene solution, mounted on Entellan and observed under an

optical microscope Axioplan – ZEISS. Images were captured with an MRc5 AxioCam digital camera and processed with the Axiovision program. The percentage of infected cells and the number of intracellular parasites per macrophage were counted and the infection index was obtained by multiplying both numbers [4,5]. The number of tight-fitting or loose-fitting vacuoles containing *T. gondii* was also counted. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean values; a $p < 0.05$ was considered significant.

8. Scanning electron microscopy

Coverslips containing adhered infected macrophages were fixed for 1 h in 4% recently prepared formaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.4. Cells were dehydrated in acetone. Cells were critical point dried and had their upper part scraped off with adhesive tape, revealing the internal organization of vacuoles [21,28]. After that, cells were metalized with gold by sputtering (25 nm thick) and observed in a JSM 6490 LQ Jeol scanning electron microscope.

9. Analysis of nitric oxide production

The production of NO was indirectly assessed by reading nitrite in the culture supernatants by the Griess reagent. The supernatants were mixed at a ratio of 1:1 with the Griess reagent (1 volume of 1% Sulfanilamide in 5% phosphoric acid in deionized water with an equal volume of 0.1% N-[1-naphthyl] ethylenediamine in deionized water). After 10 minutes, the mixture was read in an ELISA reader (540 nm) and quantification of NO production was based on a standard curve sodium nitrite in DMEM [29]. The Student *t* test was used to compare mean values, a $p < 0.05$ was considered significant.

10. In vivo infections

C57BL/6 mice were intraperitoneally inoculated with 1×10^4 of the PS⁻, PS⁺ subpopulation or the total population of tachyzoites. Deaths of mice were recorded daily and a Kaplan Meier survival curve and statistical analysis performed. Spleens and livers of recently dead mice were collected and processed for transmission electron microscopy.

References

- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217–1258.
- Carruthers VB (2002) Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 81: 111–122.
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004) *Toxoplasmosis*. *Lancet* 12: 1965–1976.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA (2004) *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 744–752.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA (2002) *Toxoplasma gondii* inhibits nitric oxide production by activated mouse macrophages. *Exp Parasitol* 100: 62–70.
- Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Jr., Krahenbuhl JL (1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii* role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 144: 2725–2729.
- Guillermo LVC, DaMatta RA (2004) Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poultry Science* 83: 776–782.
- Lüder CG, Algner M, Lang C, Bleicher N, Gross U (2003) Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int J Parasitol* 33: 833–844.
- Rozenfeld C, Martinez R, Seabra SH, Sant'anna C, Gonçalves JGR, et al. (2005) *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon- γ -activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor- β 1 production by infected microglia. *Am J Pathol* 167: 1021–1031.
- Fadok VA, Bratton DL, Henson PM (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108: 957–962.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, et al. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890–898.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM (2002) Phosphatidylserine dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109: 41–50.
- 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.
- Wanderley JL, Barcinski MA (2010) Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cell Mol Life Sci* 67: 1653–1659.
- de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, et al. (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11: 1870–1873.
- 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.
- DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt ACV, Manhães L, et al. (2007) *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 266: 29–33.
- Mercer J, Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320: 531–535.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Science* 108: 2457–2464.
- Jones TC, Yeh S, Hirsch JG (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med* 136: 1157–1172.
- Caldas LA, Attias M, de Souza W (2009) Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS Microbiol Lett* 301: 103–108.

11. Light microscopy, transmission electron microscopy and quantification of the cell types in spleen and liver of infected mice

LLC-MK2 and macrophages interacted with the PS⁻ or PS⁺ subpopulations of *T. gondii* for 30 min were washed and fixed with the same solution used for scanning electron microscopy (item 8). Small fragments of recently obtained spleens and livers were fixed with the same solution. Samples were washed, post-fixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated with acetone and embedded in epoxy resin. Semi-thin sections were stained with 1% toluidine blue solution (light microscopy) and ultrathin sections (80 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate (transmission electron microscopy). Ultrathin sections were observed in a Tecnai Spirit transmission electron microscope at 120 KV.

For quantification of the cell types found in spleen and liver of infected mice (with the total tachyzoite population, the PS⁻ or the PS⁺ subpopulation), alternative semi-thin sections of both tissues were obtained from 2 infected mice that had recently died in the groups. A total of six sections per animal from each group were stained with 1% toluidine blue solution and cells were counted in 4 randomly chosen microscopic fields. Mean numbers of cells were compared between tissues from mice infected with the total population and the PS subpopulations. The Student *t* test was used to compare significant differences ($p < 0.05$) of the mean values.

Acknowledgments

The authors thank Francisco Medros Junior and Eliandro Lima for technical assistance and Andr ea C. C esar for reviewing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TATS LAC WS RAD SHS. Performed the experiments: TATS JAP JCDS LAC WS RAD SHS. Analyzed the data: TATS JAP JCDS LAC WS RAD SHS. Contributed reagents/materials/analysis tools: WS RAD SHS. Wrote the paper: TATS LAC WS RAD SHS.

22. Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE (2008) Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Method Enzymol* 438: 77–93.
23. Kozmar A, Greenlee-Wacker MC, Bohlson SS (2010) Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. *J Innate Immun* 2: 248–259.
24. Souza W, DaMatta RA, Attias M (2009) Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 149–154.
25. Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, Osborn T, Reiser J, et al. (2010) Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 29: 3593–3606.
26. Bajno L, Peng X-R, Schreiber AD, Moore H-P, Trimble WS, et al. (2000) Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149: 697–705.
27. Praefcke GJK, McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133–147.
28. de Souza W, Campanati L, Attias M (2008) Strategies and results of field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) in the study of parasitic protozoa. *Micron* 39: 77–87.
29. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131–138.