

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO (UENF)

Marcos Roberto Dias Campos

Evasão da via microbicida de óxido nítrico e desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em diferentes tipos de macrófagos peritoneais de camundongos

Campos dos Goytacazes, RJ – Brasil
Fevereiro/2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
(UENF)

Marcos Roberto Dias Campos

**Evasão da via microbicida de óxido nítrico e desenvolvimento de
Toxoplasma gondii em diferentes tipos de macrófagos peritoneais de
camundongos**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia (PGBB) do
Centro de Biotecnologia e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Renato Augusto DaMatta

Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil

Fevereiro/2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
(UENF)


Marcos Roberto Dias Campos

**Evasão da via microbicida de óxido nítrico e desenvolvimento de
Toxoplasma gondii em diferentes tipos de macrófagos peritoneais
de camundongos**


Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia (PGBB) do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 10 de Fevereiro de 2026


Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALBA LUCINIA PEIXOTO RANGEL GAMA**
Data: 22/04/2026 12:26:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Alba Lucínia Peixoto Rangel - LBR/CBB/UENF

Documento assinado digitalmente
 **MILTON MASAHIKO KANASHIRO**
Data: 22/04/2026 12:17:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Milton Masahiko Kanashiro - LBR/CBB/UENF

Documento assinado digitalmente
 **TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO**
Data: 14/04/2026 16:27:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Tiago Wilson Patriarca Mineo - UFU

Documento assinado digitalmente
 **RENATO AUGUSTO DA MATTA**
Data: 28/04/2026 16:01:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

AGRADECIMENTOS:

1 Agradeço a Deus pelo milagre da vida, por tornar tudo possível, por ter
2 me dado oportunidades e pelos planos que fez para mim. Sem Ele, nada seria
3 possível.

4 Agradeço à Nossa Senhora Aparecida por interceder por mim e por ter
5 participado no milagre da vida.

6 Agradeço à minha mãe, Vania Nara, pelos ensinamentos, por ser
7 exemplo de pessoa e de professora. Agradeço por ter sido o meu norte, minha
8 inspiração, minha base e o principal motivo de eu nunca desistir dos meus
9 sonhos.

10 Agradeço ao meu irmão, João Pedro, pelos momentos felizes, tristes e
11 estressantes. Agradeço por ter sido o melhor irmão do mundo e por ter sido
12 minha inspiração

13 Agradeço a Tatiele Alves pelos conselhos, momentos vividos e pelo
14 apoio que sempre me deu

15 Agradeço ao meu pai, Rui Carlos, falecido em 2009, por ter sido minha
16 inspiração para fazer ciência e atuar na pesquisa sobre o parasito que eu
17 trabalho.

18 Agradeço à minha madrinha, Alba Lívia, e ao meu tio, Carlos Alberto, por
19 terem me ajudado várias vezes com locomoção, por acreditarem na minha
20 capacidade e por terem participado ativamente na minha vida.

21 Agradeço à minha prima Carla Apolinário por ter sido um exemplo de
22 pessoa e ter demonstrado que, quando luta para conquistar o que almeja, tudo
23 torna possível. Agradeço por ter sido minha inspiração em ser um estudante
24 que busca sempre aperfeiçoar o conhecimento.

25 Agradeço especialmente à minha tia Fernanda por ter participado de
26 forma bem notória na minha vida.

27 Agradeço aos meus avós: João Pedro, Eli Ribeiro, Vanilda Dias e
28 Natalino Hermenegildo (todos falecidos), por terem participado na construção
29 dos meus valores.

30 Agradeço, de forma especial, à minha professora do ensino médio,
31 Madalena, que foi quem me motivou a fazer Biologia.

1 Agradeço ao Lucas de Sena por entrar na minha vida no momento que
2 mais precisei. Tenho certeza que foi Deus. Agradeço por você ser você:
3 incrível. Eu agradeço imensamente por todos os momentos. Agradeço por ter
4 sido o melhor amigo que precisei. Agradeço pela parceria, pelas conversas e
5 pela amizade. Você foi e é incrível. Esta é a palavra que mais descreve sua
6 presença na minha vida. Sou grato por tudo o que fez e pela consideração que
7 tem por mim. Sou grato por sempre ter acreditado em mim. Jamais esquecerei
8 nossa amizade.

9 Agradeço ao Elias de Melo por ter sido um grande amigo em todos esses
10 anos.

11 Agradeço à Amanda Mello por ser minha melhor amiga, minha
12 companheira, meu porto seguro e minha dupla. Sempre serei grato por todos os
13 momentos que vivemos e que ainda viveremos. Agradeço por ter sido tão ímpar
14 na minha vida nos momentos que precisei de apoio.

15 Agradeço à Taymara Sabino por ter sido minha parceira, minha “dupla
16 de dois”. Agradeço pelas sugestões, motivações, pelos momentos incríveis
17 vividos, pela amizade, lealdade, sinceridade e por ter feito o meu mestrado
18 mais feliz. Jamais esquecerei todos os momentos. Será eternamente minha
19 “dupla de dois”.

20 Agradeço à Lícia Paula pelos momentos inesquecíveis no laboratório e
21 fora dele e pelas inúmeras conversas que tivemos que foram extremamente
22 importantes para minha formação pessoal e profissional. Agradeço pela
23 amizade e colaboração que carregarei para vida.

24 Agradeço a Eliane Pegado por sempre ter acreditado na minha
25 capacidade. Agradeço pelos momentos vividos, pelas conversas, pela amizade
26 e por ter sido tão importante na minha vida. Carregarei nos meus pensamentos
27 para sempre.

28 Agradeço a Renata Vasconcelos por ter sido solícita comigo, por
29 acreditar na minha capacidade, pelo apoio e por toda amizade. Sempre serei
30 grato.

31 Agradeço a Ana Beatriz pela amizade, pelos desabafos, pelos
32 ensinamentos e pelos momentos vividos.

33 Agradeço ao Yago Moreira pela amizade, pelas voltas de bicicleta, pelos
34 dias de jogos e por todas as conversas que tivemos.

1 Agradeço ao professor e coordenador da licenciatura, Jorge Hudson
2 Petretski, meu psicólogo diário, meu conselheiro, meu grande mestre no campo
3 da vida e um dos meus melhores amigos. Obrigado por ter sido tão incrível
4 nesses anos. Obrigado por ter sido tão sincero sobre as coisas que aconteciam
5 comigo. Obrigado por ter sido a ponte entre a ignorância e o saber. Agradeço
6 por ter sido meu mentor. Sempre serei seu fã. Levarei comigo para sempre os
7 seus ensinamentos.

8 Agradeço ao professor e meu orientador, Renato Augusto DaMatta, por
9 ter sido um pai para mim. Agradeço por ter me oferecido a oportunidade de
10 atuar no laboratório. Agradeço por ter acreditado no meu potencial. Agradeço
11 por ter me dado o melhor projeto que um aluno teria. Agradeço por todos os
12 momentos, pelos ensinamentos e pelos conselhos. Serei um eterno
13 “DaMattinha” porque, desde que eu entrei no laboratório, foi minha inspiração
14 como cientista.

15 Agradeço ao professor Sérgio Henrique Seabra pelos ensinamentos,
16 mentorias, dicas, sugestões, colaboração, pelos momentos de diversão, por ter
17 sido um exemplo de cientista, pelos jogos de futebol e pelas músicas
18 compartilhadas.

19 Agradeço ao Pedro Souto Rodrigues pelos ensinamentos que, de forma
20 prática, foi meu coorientador. Agradeço por ter me ensinado sobre as células
21 mais incríveis do mundo. Agradeço pelos momentos vividos, pela amizade,
22 pelas sugestões, por ter sempre acreditado em mim.

23 Agradeço à Natália Almeida por ter sido minha companheira e minha
24 irmã de outra mãe. Agradeço por ter sido a primeira pessoa a me acolher no
25 laboratório, por ser minha coorientadora de vida que, com sua experiência
26 pessoal, sugere como devo proceder em situações adversas. Agradeço por ter
27 me apresentado o melhor parasito do mundo e pelos momentos mais incríveis
28 nesses anos. Sempre carregarei os nossos momentos em meus pensamentos.

29 Agradeço aos técnicos Adriana Martins, Fábio Conceição, Juliana
30 Azevedo, Maurício de Oliveira, Darli Grativol e Rosemary Maciel pela amizade,
31 pelo excelente trabalho e pelos ensinamentos. Sem eles o trabalho não seria
32 possível.

33 Agradeço aos colegas e amigos do laboratório Daniel Areias, Ismael
34 Moté, Arícia Leone, Maicley Ferreira, Gigliola Macchi, Giullia Rios, Karla

1 oliveira, Lara Manhães, Saulo Pireda, Samuel Rocha, Felipe Moreira, Frederico
2 Nolasco, Saulo Cruz, Ana Carolina, Tâmara Carolina, Maria Alice e aos demais
3 pelos momentos, pelas dicas, pelo carinho e pela amizade.

4 Agradeço ao Fernando César que, desde o primeiro período, foi meu
5 grande conselheiro e sempre acreditou na minha capacidade.

6 Agradeço, de forma bem especial, ao senhor Antônio, ex funcionário da
7 secretaria do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT), e ao professor Enrique
8 Medina por terem me dado uma direção durante a graduação, por terem sido
9 grandes conselheiros e excelentes pessoas para mim.

10 Agradeço de forma especial ao professor Clóvis de Paula por sempre ter
11 acreditado na minha capacidade e por ter me motivado a fazer iniciação
12 científica nota 10.

13 Agradeço ao professor Milton Masahiko Kanashiro que, direta e
14 indiretamente, me ajudou na pesquisa.

15 Agradeço ao professor Antônio Cogo por ter revisado o presente
16 trabalho.

17 Agradeço às instituições de fomento CNPq, CAPES, FAPERJ e UENF
18 que disponibilizaram a bolsa e investiram na pesquisa.

19 Agradeço ao PGBB pelas oportunidades oferecidas e pelo trabalho
20 realizado.

21

22

“I believe in my dreams”

23

SUMÁRIO	
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2.2. MACRÓFAGOS	21
2.3. INTERAÇÃO <i>T. gondii</i> E MACRÓFAGOS	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. METODOLOGIA	33
4.1. MANUTENÇÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i> CEPA ME-49	33
4.2. MANUTENÇÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i> CEPA RH	34
4.3. OBTENÇÃO, CULTIVO E ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES E ESTIMULADOS	34
4.4. INTERAÇÃO MACRÓFAGOS E <i>Toxoplasma gondii</i> DA CEPA ME-49 E RH	35
4.5. DOSAGEM DE NO	35
4.6. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	35
4.7. SOLTURA E VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS	36
4.8. CITOMETRIA DE FLUXO	36
5. RESULTADOS	36
5.1. PRODUÇÃO DE NO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES INFECTADOS COM <i>Toxoplasma gondii</i> CEPA RH E ME-49	36
5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iNOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES INFECTADOS COM A CEPA RH E ME-49	37
5.3. INTERAÇÃO PARASITO E MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES	40
5.4. PRODUÇÃO DE NO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS INFECTADOS COM <i>Toxoplasma gondii</i> CEPA RH E ME-49	41

5.5.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iNOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS INFECTADOS COM A CEPA RH E ME-49	42
5.6.	INTERAÇÃO PARASITO E MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS.....	43
5.7.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iNOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
6.	DISCUSSÃO.....	50
7.	CONCLUSÃO.....	57
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

BH4: Tetrahidrobiopterina

BSA: *Bovine serum albumin*

CCR2: *C-C chemokine receptor 2*

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FMN: Flavina mononucleotídeo

GATA6: *Gata binding protein 6*

IFN- γ : Interferon-gamma

Ig: Imunoglobulina

I κ B: Inibidor de Kinase B

I κ K: Inibidor κ B Kinase

IL- Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

IRF-1: *Interferon regulatory factor 1*

JAK: Janus Kinase

LLC-MK2: Célula com morfologia epitelial de rim isolado de macaco

LPM: *Large Peritoneal Macrophage*

LPS: Lipopolissacarídeo

M1: Macrófagos ativados em perfil pró-inflamatório

M2: Macrófagos ativados em perfil anti-inflamatório

MerTK: *Tyrosine-protein kinase MER receptor*

MHC II: *Major Histocompatibility complex class II*

MOEst: Macrófagos Peritoneais Estimulados por baixo inóculo de *T. gondii*
cepa ME-49

MORes: Macrófagos Peritoneais Residentes

MYD88: Diferenciação mieloide 88

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF- κ B: *Nuclear factor Kappa B*

NO: Óxido Nítrico

NOX: NADPH oxidase

PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns*

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PRRs: *Pattern recognition receptor*

PS: Fosfatidilserina

ROS: *Reactive oxygen species*

SFB: Soro fetal bovino

SPM: *Small Peritoneal Macrophage*

STAT-1 α : *Signal Transducer And Activator Of Transcription 1*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TIM-4: *T-cell membrane protein 4*

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

TRAF6: Receptor - fator estimulador de necrose tumoral associado ao fator 6

VP: Vacúolo parasitóforo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. Felino como hospedeiro definitivo se contamina a partir da carnivoría obtendo bradizoítos em cistos teciduais (1). Posteriormente, o felino elimina oocistos no ambiente que passa por esporogonia, originando esporozoítos. Bovinos, suínos, caprinos e seres humanos se contaminam pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos esporulados obtendo-se esporozoítos (2) ou se contamina pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos presentes em carne crua ou mal cozida (3). Bradizoítos ou esporozoítos infectam os seres humanos e se diferenciam em taquizoítos (3). Taquizoítos realizam o ciclo lítico. Em gestantes, podem atravessar a barreira placentária e infectar o feto podendo causar aborto (5). Caso o hospedeiro seja imunocompetente, induzirá o parasito a se diferenciar de bradizoítos em cistos teciduais (6). Assim, o felino pode se infectar pela carnivoría, reiniciando o ciclo. (Adaptado de Ferguson, 2002).

Figura 2. Ciclo lítico de *Toxoplasma gondii*. Ciclo lítico pode ser dividido em 5 fases. (1) Adesão à superfície da célula hospedeira; (2) reorientação seguido de invasão; (3) formação do vacúolo parasitóforo; (4) replicação e formação de rosetas e (5) evasão e infecção de uma nova célula. (Adaptado de Black & Boothroyd, 2000).

Figura 3. Origem dos macrófagos residentes teciduais. Macrófagos são derivados de células precursoras embrionárias oriunda do saco vitelínico ou fígado fetal (no desenvolvimento embrionário) e originário de monócitos provindo da medula óssea (vertebrados adultos). Conforme o tipo de tecido que se estabelecem, os macrófagos apresentam diferenças fenotípicas. A maioria dos macrófagos residentes provém de células precursoras e outra parte provém de monócitos (Traduzido de Gordon & Pludemann, 2017).

Figura 4. Origem das subpopulações de macrófagos peritoneais de camundongos. Subpopulação macrófago peritoneal grande (LPM) origina de células progenitoras do saco vitelínico, mantendo-se no peritônio por autorrenovação, enquanto macrófago peritoneal pequeno (SPM) provém e é restabelecido por monócitos circulantes, oriundos de células tronco hematopoiéticas da medula óssea (Traduzido de Cassado *et al.*, 2015).

Figura 5. Microambiente peritoneal em condições de homeostasia e em microambiente inflamado. Em homeostase, macrófagos residentes do peritônio são LPM (mais abundante) e SPM (menos abundante) e monócitos clássicos (inflamatórios) e monócitos alternativos (não inflamatórios) que circulam pela corrente sanguínea. Em microambiente inflamado, ocorre influxo de monócitos clássicos, aumento da subpopulação SPM e migração da subpopulação LPM, auxiliando as células B a produzirem IgA (Traduzido e modificado de Cassado *et al.*, 2015)

Figura 6. Cascatas de sinalização da ativação de iNOS a partir do estímulo de LPS e IFN- γ . LPS é reconhecido pelo receptor *Toll-like receptor 4* (TLR4) que através de moléculas adaptadoras do receptor - fator estimulador de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF6) e resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MYD88), induzem cascata de fosforilação via NF- κ B que desacopla de seu inibidor e migra para o núcleo, onde se liga à região promotora do gene da iNOS. IFN- γ é reconhecido por seu receptor IFNR que através de Janus Kinase (JAK) fosforila STAT-1 α . Esta molécula dimeriza, migra para o núcleo, onde se liga a região promotora do gene Fator Regulatório de Interferon-1 (IRF-1), capaz de se ligar à região promotora do gene da iNOS. Após a expressão de iNOS, ocorre a síntese de NO (Traduzido de Cinelli *et al.*, 2020).

Figura 7. Esquematização dos domínios da enzima homodimérica iNOS. Cada dímero possui um domínio redutase (NAD, FAD, FMN) e um domínio oxidase (BH4, Heme e calmodulina). O processo de produção de NO é exercido de um dímero para outro (Traduzido de Minhas *et al.*, 2020).

Figura 8. Porcentagem relativa da produção de NO de macrófagos peritoneais residentes (MORes). MORes não-infectados (controle - coluna preta) e infectados (coluna cinza) com *Toxoplasma gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (B) (n= 5 experimentos independentes). Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde $**P < 0,01$.

Figura 9. Detecção de iNOS por imunofluorescência em macrófagos peritoneais residentes ativados (MORes) infectados com *Toxoplasma gondii*. (A) Expressão de iNOS (verde) em MORes não infectados (controle) e infectados com *T. gondii* RH ou ME-49 (vermelho); MORes (DAPI - azul) após 2 e 24 h. (B) Percentagem de macrófagos iNOS+ e iNOS- em MORes não infectados (CON) desafiados com *T. gondii* após 2 e 24 h, sem parasito dentro da célula (N/INF) ou com parasito (INF); (n = 4 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Figura 10. Interação entre macrófagos residentes peritoneais (MORes) que expressam iNOS (iNOS+) ou não (iNOS-) e *Toxoplasma gondii*. Percentagem de MORes iNOS+ (coluna preta) e MORes iNOS- (coluna cinza) infectados com *T. gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (D) por 2 e 24 horas. Número de parasitos por MORes iNOS+ e MORes iNOS- infectados com cepa RH (B) ou ME-49 (E). Índice de infectividade (% de MORes iNOS+ e iNOS- infectados \times média de parasitos por MORes infectado) de MORes iNOS+ e iNOS- infectados com cepa RH (C) ou ME-49 (F) (n = 5 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Figura 11. Percentagem relativa da produção de NO de macrófagos peritoneais estimulados (MOEst). MOEst não infectados (controle – coluna preta) e infectados (coluna cinza) com *Toxoplasma gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (B) (n = 5 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde ** $P < 0,01$).

Figura 12. Detecção de iNOS por imunofluorescência em macrófagos peritoneais estimulados ativados (MOEst) infectados com *Toxoplasma gondii*. (A) Expressão de iNOS (verde) em MOEst não infectados (DAPI - azul) (controle) que vieram sem antígenos peritoneais (CON N/ANT) e com antígenos peritoneais (CON W/ANT) e MOEst infectados com a cepa ME-49 ou a cepa RH de *T. gondii* (vermelho) após 2 e 24 horas. (B) Análise da razão iNOS+ e iNOS- em MOEst não infectados (controle) e desafiados com a cepa ME-49 ou RH de *T. gondii* após 2 e 24 horas, mostrando células sem parasito (N/infectado) ou com parasito (infectado) (n = 4 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Figura 13. Interação entre macrófagos peritoneais estimulados (MOEst) que expressam iNOS (iNOS+) ou não (iNOS-) e *Toxoplasma gondii*. Percentagem de MOEst iNOS+ (coluna preta) e MOEst iNOS- (coluna cinza) infectados com *T. gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (D) após 2 e 24 horas. Número de parasitos por MOEst iNOS+ e MOEst iNOS- infectados com cepa RH (B) ou ME-49 (E). Índice de infectividade (% de MOEst iNOS+ e iNOS- infectados \times média de parasitos por MOEst infectado) de MOEst iNOS+ e iNOS- infectados com cepa RH (C) ou ME-49 (F) (n = 5 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Figura 14. Teste de recuperação de macrófagos peritoneais residentes. Células soltas por choque térmico sob PBS ou PBS + EDTA com diferentes concentrações à 4°C durante 20 min. (n = 3 experimentos independentes).

Figura 15. Soltura e viabilidades dos macrófagos. Macrófagos peritoneais residentes soltos em PBS ou PBS + êmbolo da seringa à temperatura de 4°C e identificados por tamanho (FSC) e granulidade (SSC), selecionando macrófagos como a população R1 e viabilidade desta população por iodeto de propídio (PI) (A). Análise quantitativa das células soltas e viabilidade (B) (n = 3 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD).

Figura 16. Expressão de iNOS por citometria de fluxo em macrófagos peritoneais residentes infectados por *Toxoplasma gondii*. Macrófagos peritoneais residentes (P1) não interagido (CON) e interagido com *T. gondii* cepa RH (INF RH), com a análise de expressão de iNOS (PE) e parasito (FITC) após 2 h (A) ou 24 h de interação (C). Análise quantitativa da relação entre células iNOS+ (coluna preta) e iNOS- (coluna cinza) de MORes não interagido (CON) e interagido - sem parasitos internalizados (N/INF) ou internalizados (INF) – após 2 h (B) ou 24 h (D). (n = 1 experimento independente).

1 **Resumo**

2 *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo
3 Apicomplexa. O parasito infecta células nucleadas incluindo macrófagos.
4 Macrófagos são células heterogêneas capazes de controlar replicação de *T.*
5 *gondii* através da produção de óxido nítrico (NO) via NO sintase induzível
6 (iNOS). O parasito inibe a produção de NO, podendo ser pela degradação de
7 iNOS ou pela perda de função da enzima, dependendo do tipo de linhagem
8 estabelecida de macrófago infectado. No entanto, não se sabe se o parasito
9 inibe NO modulando iNOS em diferentes tipos de macrófagos de cultura
10 primária. Assim, a produção de NO e expressão de iNOS foram avaliados em
11 dois tipos de macrófagos peritoneais: residentes (MORes) e estimulados
12 (MOEst) com baixa quantidade de *T. gondii*. Os macrófagos peritoneais foram
13 cultivados e ativados com interferon- γ e lipopolissacarídeo por 24 h.
14 Posteriormente, os macrófagos foram infectados com *T. gondii* cepa RH ou ME-
15 49 por 2 ou 24 h. Após a infecção, a produção de NO foi avaliada por reagente
16 de Griess e a expressão de iNOS por microscopia de fluorescência e citometria
17 de fluxo. Após 24 h de interação, MORes e MOEst infectados com a cepa RH
18 diminuíram a produção de NO, enquanto macrófagos infectados pela cepa ME-
19 49 não apresentaram inibição. MORes infectados com a cepa RH diminuiu a
20 expressão de iNOS, enquanto àqueles infectados com a cepa ME-49
21 mantiveram a expressão. MOEst manteve a expressão de iNOS após infecção
22 com ambas as cepas. A cepa RH foi capaz de proliferar em MORes e MOEst,
23 mais eficientemente em células que não expressavam iNOS, enquanto a cepa
24 ME-49 foi destruída em células que expressavam e que não expressavam
25 iNOS em MORes e MOEst. Dessa forma, a cepa RH inibiu a produção de NO
26 de MORes pela diminuição da expressão de iNOS, enquanto em MOEst a via
27 de inibição de NO não ocorreu pela diminuição da expressão de iNOS e o
28 parasito apresentou maior proliferação em células que não expressavam iNOS.
29 Além disso, a cepa ME-49 não inibiu a produção de NO, nem diminuiu a
30 expressão de iNOS e foi destruída em ambos os tipos de macrófagos.

31

32 **Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; Macrófagos peritoneais; iNOS; NO.

1 **Abstract**

2 *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite of the phylum
3 *Apicomplexa* that infects nucleated cells, including macrophages. Macrophages
4 are heterogeneous cells capable of controlling *T. gondii* replication through nitric
5 oxide (NO) production mediated by inducible nitric oxide synthase (iNOS). The
6 parasite can inhibit NO production either by iNOS degradation or by impairing
7 enzyme function, depending on the macrophage lineage. However, it remains
8 unclear whether *T. gondii* modulates iNOS in different types of primary
9 macrophages. Thus, NO production and iNOS expression were evaluated in
10 two types of peritoneal macrophages, resident (ResMO) and elicited (StMO)
11 with a low inoculum of *T. gondii* in mice. Macrophages were activated with
12 interferon- γ and lipopolysaccharide for 24 h and subsequently infected with the
13 RH or ME-49 strains for 2 and 24 h. NO production was assessed using the
14 Griess reagent, and iNOS expression was analyzed by fluorescence
15 microscopy and flow cytometry. After 24 h of interaction, ResMO and StMO
16 infected with the RH strain showed reduced NO production, whereas infection
17 with the ME-49 strain did not inhibit NO production. RH-infected ResMO
18 exhibited decreased iNOS expression, but did not ME-49-infected ResMO.
19 StMOEst maintained iNOS expression after infection with both strains. The RH
20 strain proliferated in both macrophage populations, more efficiently in cells
21 lacking iNOS expression, whereas the ME-49 strain was eliminated in both
22 iNOS-expressing and non-expressing cells. These findings indicate that the RH
23 strain inhibits NO production in ResMO, decreasing iNOS expression, while a
24 distinct inhibitory via operates in MOEst. In contrast, the ME-49 strain neither
25 inhibited NO production nor reduced iNOS expression and was efficiently
26 eliminated by both type of macrophage.

27

28 Key-words: *Toxoplasma gondii*; Macrophages; iNOS; NO.

1. INTRODUÇÃO

2

3 *Toxoplasma gondii* é um protozoário cosmopolita, que infecta
4 vertebrados homeotérmicos causando a toxoplasmose (Dubey *et al.*, 1998;
5 Carruthers *et al.*, 2002). Estima-se que 1/3 da população humana seja
6 soropositiva (Sengupta *et al.*, 2025). A gravidade da doença depende da cepa e
7 do sistema imunológico do hospedeiro. Embora na maioria dos casos a
8 infecção seja assintomática, torna-se um grande problema de saúde pública
9 em alguns pacientes imunocompetentes, imunossuprimidos e gestantes
10 (Carruthers *et al.*, 2002).

11 O parasito é um dos mais bem sucedidos, capaz de infectar hospedeiros
12 vertebrados homeotérmicos e invadir células nucleadas como macrófagos
13 (Vischer & Suter, 1954; Djurković-Djaković *et al.*, 2019). Macrófagos
14 inflamatórios (perfil M1) controlam a proliferação do parasito através da
15 produção de óxido nítrico (NO) (Adams *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2024),
16 molécula produzida a partir da expressão de NO sintase induzível (iNOS) que
17 utiliza L-arginina como substrato. Porém, o grupo vem mostrando que o
18 parasito inibe a produção de NO (Seabra *et al.*, 2002) através da exposição de
19 fosfatidilserina e indução de Tumor Growth Factor- β (TGF- β) que, por
20 sinalização autócrina e parácrina, diminui a microbicidade dos macrófagos
21 (Seabra *et al.*, 2004), pois a iNOS é degradada pelo proteassomo (Padrão *et al.*
22 *et al.*, 2014). No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que o parasito inibe
23 a produção de NO de forma distinta, degradando ou não iNOS, conforme o tipo
24 de linhagem estabelecida de macrófago (Cabral *et al.*, 2018).

25 Porém, não se sabe se a inibição da produção de NO envolve
26 degradação ou não de iNOS em diferentes tipos de macrófagos primários.
27 Dessa forma, o presente estudo visou avaliar se diferentes cepas de *T. gondii*,
28 RH e ME-49, inibem a produção de NO de distintas formas em macrófagos
29 peritoneais residentes e macrófagos peritoneais estimulados oriundo de
30 peritonite causada por baixo inóculo de *T. gondii* cepa ME-49.

1 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 2.1. *Toxoplasma gondii*

3 *Toxoplasma gondii* foi identificado por Afonso Splendore, e Nicolle e
4 Marceaux em 1908 (Dubey *et al.*, 1998). “*Toxon*” em grego significa “arco”, e
5 “plasma” significa “forma”, ou seja, “parasito em forma de arco”. A palavra
6 “*gondii*” derivou da espécie do qual se isolou o parasito, *Ctenodactylus gundi*. *T.*
7 *gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório do filo Apicomplexa
8 (Dubey *et al.*, 1998). É agente etiológico da toxoplasmose (Carruthers *et al.*,
9 2002). É um parasito cosmopolita capaz de infectar células nucleadas de
10 vertebrados homeotérmicos (Tenter *et al.*, 2000). Possui felinos como
11 hospedeiro definitivo e outros diversos animais como hospedeiros
12 intermediários (Dubey *et al.*, 1998). O ciclo biológico é complexo e
13 caracterizado como heteróxico (Black e Boothroyd, 2000). Inicia-se com o
14 felino ao ingerir cistos teciduais com bradizoítos, através da carnivorina, ou pela
15 ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos (Fig. 1) (Attias, *et al.*,
16 2020; Blader *et al.*, 2015). Os cistos teciduais ou oocistos são lisados pela ação
17 de enzimas proteolíticas e liberam bradizoítos ou esporozoítos,
18 respectivamente. Estes, por sua vez, infectam os enterócitos, diferenciam-se
19 em merozoítos e passam por esquizogonia (Attias, *et al.*, 2020). Após
20 sucessivas replicações, infectam os enterócitos vizinhos e eventualmente se
21 diferenciam em microgametócito e macrogametócito (Attias, *et al.*, 2020).
22 Quando os gametas se encontram, ocorre a formação de oocisto que, com as
23 fezes do felino, é excretado no ambiente. Em condições de temperatura e
24 umidade adequadas, esporulam, originando dois esporocistos, cada um
25 contendo quatro esporozoítos. Oocistos esporulados podem contaminar água,
26 solo e vegetações. Hospedeiros intermediários podem se contaminar com
27 oocistos do ambiente. Assim, oocistos liberam esporozoítos que infectam os
28 enterócitos e se diferenciam em taquizoítos (forma de rápida multiplicação).
29 Estes se multiplicam nas células da lâmina própria, alcançam os vasos
30 sanguíneos e se disseminam para todo o corpo. Além disso, hospedeiros
31 intermediários podem se contaminar ao entrar em contato com taquizoítos
32 através de transfusão de sangue ou a via transplacentária da mãe para o feto
33 (Dubey *et al.*, 1998). Hospedeiros intermediários imunocompetentes controlam

1 a proliferação do parasito. Dessa forma, o parasito se diferencia em bradizoítos
 2 (forma de lenta multiplicação) e evade o sistema imune através da formação de
 3 cistos teciduais (Attias, *et al.*, 2020). Os hospedeiros intermediários podem se
 4 contaminar com cistos teciduais contendo bradizoítos através da ingestão de
 5 carnes cruas ou mal cozidas (Dubey *et al.*, 1998).

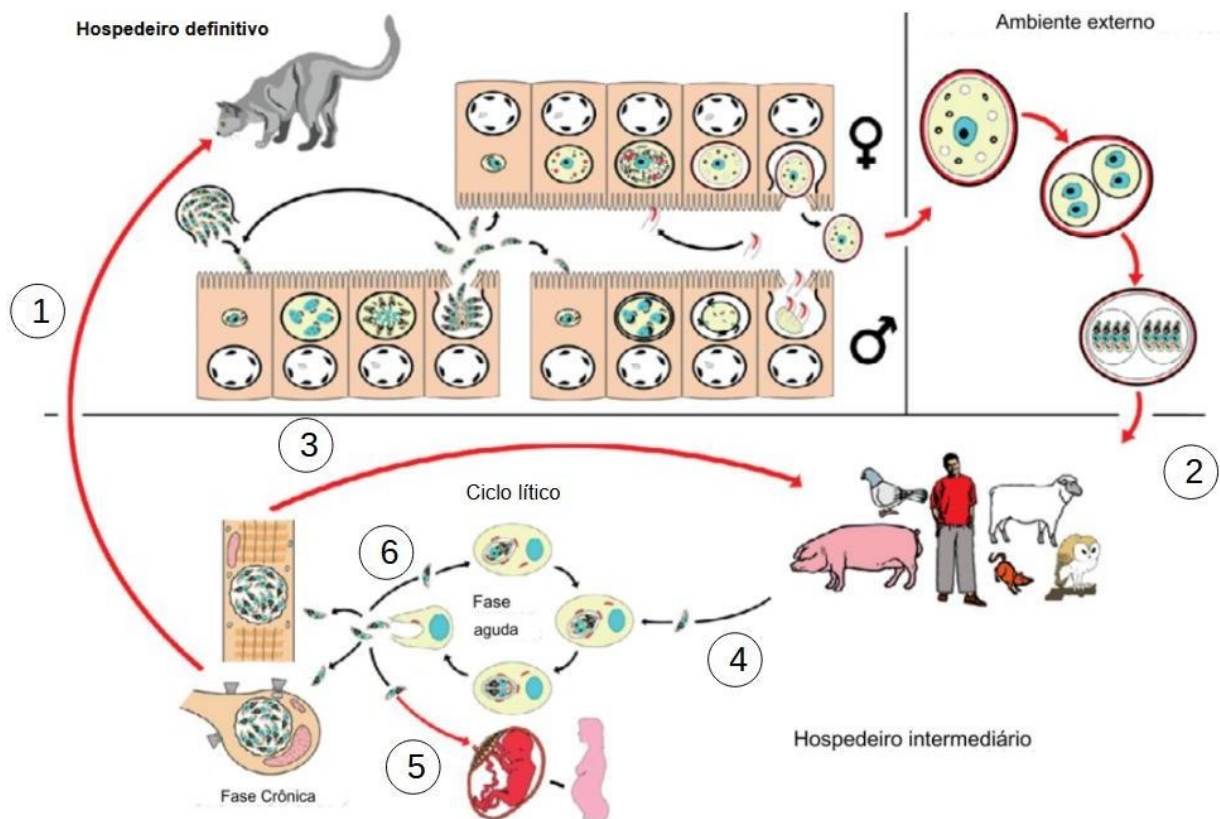


Figura 1. Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. Felino como hospedeiro definitivo se contamina a partir da carnivoría obtendo bradizoítos em cistos teciduais (1). Posteriormente, o felino elimina oocistos no ambiente que passa por esporogonia, originando esporozoítos. Bovinos, suínos, caprinos e seres humanos se contaminam pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos esporulados obtendo-se esporozoítos (2) ou se contaminam pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos presentes em carne crua ou mal cozida (3). Bradizoítos ou esporozoítos infectam os seres humanos e se diferenciam em taquizoítos (3). Taquizoítos realizam o ciclo lítico. Em gestantes, podem atravessar a barreira placentária e infectar o feto podendo causar aborto (5). Caso o hospedeiro seja imunocompetente, induzirá o parasito a se diferenciar em bradizoítos em cistos teciduais (6). Assim, o felino pode se infectar pela carnivoría, reiniciando o ciclo. (Adaptado de Ferguson, 2002).

6
 7 Estima-se que 1/3 da população humana seja soropositivo para *T. gondii*
 8 (Tenter *et al.*, 2000). No Brasil, cerca de 40% da população está infectada
 9 (Pappas *et al.*, 2009). A gravidade da doença é heterogênea, dependendo da
 10 cepa infectante e do sistema imunológico do hospedeiro (Smith *et al.*, 2021).
 11 Em imunocompetentes, o sistema imunológico controla a replicação do

1 parasito, induz a conversão de taquizoítos para bradizoítos e forma cistos
2 teciduais. Nesses pacientes, a infecção pelo parasito é, em maioria,
3 assintomática ou com sintomas brandos e genéricos como mialgia, cefaleia e
4 febre. Em alguns casos, os pacientes podem apresentar sintomas mais graves
5 como retinocoroidite e linfadenopatia. Em relação aos pacientes
6 imunodeprimidos com síndrome da imunodeficiência adquirida, causada pelo
7 vírus da imunodeficiência humana, ou pacientes com câncer, passando por
8 sessões de quimioterapia, a gravidade da doença é maior e pode causar
9 retinocoroidite, esplenomegalia, hepatomegalia ou neurotoxoplasmose (Smith
10 *et al.*, 2021). Caso o hospedeiro seja imunocompetente, tenha cistos e passe
11 por imunodepressão, pode ocorrer conversão de bradizoítos para taquizoítos
12 levando a fase aguda da doença (Smith *et al.*, 2021). Além disso, em caso de
13 gestante na fase aguda da doença (presença de taquizoítos circulantes), o
14 parasito pode atravessar a placenta e, dependendo do tempo de gestação,
15 causar danos ao feto como hidrocefalia, microcefalia, perda de visão, audição
16 ou até mesmo aborto (Carruthers *et al.*, 2002). Sendo assim, é extremamente
17 importante o exame sorológico para *T. gondii* antes e durante a gestação
18 (Carruthers *et al.*, 2002).

19 Outro fator que pode influenciar a gravidade da doença são os fatores de
20 virulência que variam conforme o tipo de cepa. Estes fatores de virulência
21 estão relacionados ao processo de invasão de células e evasão do sistema
22 autônomo celular (Randow *et al.*, 2013) e imunológico (Howe e Sibley, 1995).
23 Organelas secretoras, como róptrias e grânulos densos, liberam proteínas
24 responsáveis pela invasão, formação do vacúolo parasitóforo (VP) e evasão
25 dos sistemas microbicidas (Saeij *et al.*, 2005). Conforme o polimorfismo e
26 quantidade de proteínas liberadas por essas organelas, o parasito apresenta
27 determinada virulência para camundongo, sendo diferenciadas geneticamente
28 em três tipos de cepas: tipo I, II e III. Cepas de *T. gondii* do tipo I é a mais
29 virulenta como a cepa RH para camundongos, enquanto cepas pouco
30 virulentas ou avirulentas são as cepas do tipo II e III, como ME-49 e VEG,
31 respectivamente (Saeij *et al.*, 2005). Além disso, no Brasil, há cepas que não se
32 encaixam nessa classificação. Dessa forma, são conhecidas como cepas
33 atípicas (Saeij *et al.*, 2005).

1 Quando o parasito interage com a célula hospedeira, o processo pode
2 ser dividido em 5 etapas: adesão, invasão, formação do vacúolo parasitóforo,
3 replicação e egresso (Black e Boothroyd, 2000). Essas etapas determinam o
4 ciclo lítico do parasito (Fig. 2). O parasito se locomove pelo movimento de
5 deslizamento (*gliding*, em Inglês) e, ao se encontrar com a membrana
6 plasmática da célula-alvo, adere. O parasito reconhece a célula-alvo por
7 possuírem proteínas de superfície que interagem com diversos tipos de
8 proteínas da célula hospedeira, o que o torna capaz de invadir diversas células
9 nucleadas. Grande parte das proteínas de superfície do parasito consiste da
10 família de proteínas relacionadas ao antígeno de superfície (SAG). SAG1 é
11 uma das que estão relacionadas ao processo de reconhecimento da célula-alvo
12 (Black e Boothroyd, 2000). Após adesão, ocorre reorientação do parasito e
13 invasão orquestrada pelas atividades dos filamentos de actina e miosina. Neste
14 processo de invasão, participam organelas secretoras como as micronemas e
15 as rôptrias (Attias *et al.*, 2020). As micronemas são responsáveis por
16 secretarem proteínas denominadas MICs que participam do movimento e
17 adesão à célula com atividade parecidas com perforinas, serinas proteases e
18 adesinas. As rôptrias secretam RONs e ROPs que estão envolvidas na
19 invasão, formação do vacúolo parasitóforo, controle da maquinaria da célula
20 hospedeira e evasão da imunidade autônoma da célula. Após formação do
21 vacúolo parasitóforo, o parasito libera proteínas de grânulo denso, outra
22 organela secretora. Essas proteínas são conhecidas como GRAs, as quais tem
23 papel na estruturação dos túbulos e estruturas filamentosas do vacúolo
24 parasitóforo. Uma vez dentro da célula e com todas essas organelas em
25 atividades, o parasito se replica por endodiogenia. Essa replicação é
26 caracterizada pela formação de duas células-filhas que ocorre dentro da célula-
27 mãe, mantendo-se conectadas pelo corpo residual (Black e Boothroyd, 2000).
28 Ocorre sucessivas replicações do parasito formando estruturas denominadas
29 rosáceas e, por fim, ocorre o egresso com a célula hospedeira sendo lisada.
30 Depois do egresso, o parasito reconhece células vizinhas e reinicia o ciclo lítico
31 (Black e Boothroyd, 2000).

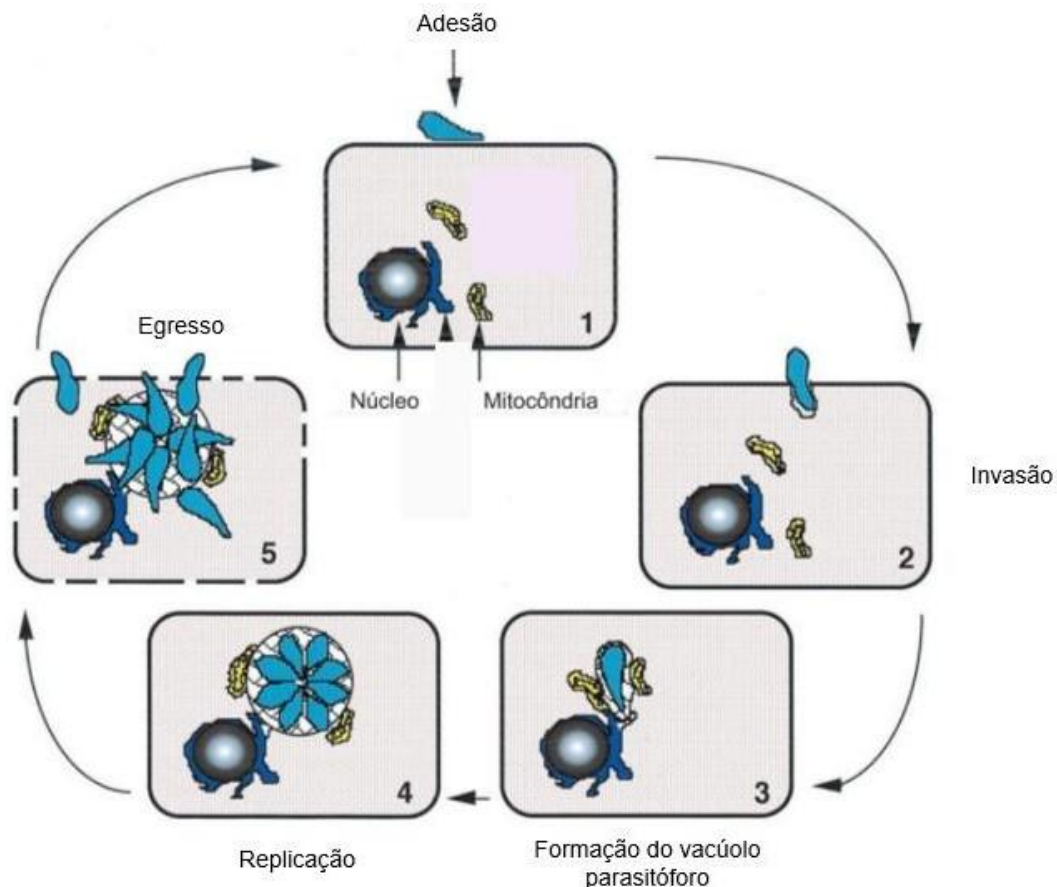


Figura 2. Ciclo lítico de *Toxoplasma gondii*. Ciclo lítico pode ser dividido em 5 fases. (1) Adesão à superfície da célula hospedeira; (2) reorientação seguido de invasão; (3) formação do vacúolo parasitóforo; (4) replicação e formação de rosetas e (5) evasão e infecção de uma nova célula (Adaptado de Black & Boothroyd, 2000).

1

2 1.1. MACRÓFAGOS

3 Uma das células nucleadas que *T. gondii* infecta são os macrófagos
 4 (Vischer & Suter, 1954). Macrófagos são células importantes na manutenção
 5 da homeostasia (Gordon & Plüddemann, 2017). São células extremamente
 6 complexas e heterogêneas que participam na mediação do sistema imune inato
 7 e adaptativo como uma célula efetora que apresenta antígenos (Taylor *et al.*,
 8 2005).

9 Além disso, estudos recentes demonstram que macrófagos possuem
 10 capacidade de memória caracterizada como resposta heteróloga. Essa
 11 resposta é gerada a partir de um estímulo inflamatório causado por um agente
 12 infeccioso que induz reprogramação metabólica e alterações epigenéticas,
 13 otimizando a expressão de proteínas relacionadas à resposta imunológica
 14 (Bekkering *et al.*, 2021). Dessa forma, quando os macrófagos são expostos a

1 outro tipo de patógeno com estrutura análoga, o macrófago é capaz de
2 responder mais rápida e eficientemente. Esse processo foi denominado
3 imunidade treinada (Netea *et al.*, 2011). Porém, dependendo do estímulo,
4 quantidade de vezes que foi estimulado e a intensidade da infecção, pode
5 ocorrer tolerância, que é um tipo de memória imunológica do macrófago
6 relacionado à diminuição da resposta após um contato prévio ao patógeno
7 (Ochando *et al.*, 2023).

8 Macrófagos podem ser induzidos com interferon-gamma a terem perfil
9 microbicida e inflamatório (ativação clássica ou M1) sendo capazes de
10 controlar proliferação de patógenos e células cancerígenas (Martinez &
11 Gordon, 2014). Além disso, os macrófagos podem ser induzidos com
12 interleucina-4 (IL-4) ou IL-10 a terem perfil reparador e anti-inflamatório com
13 atividade de reparação tecidual com capacidade de síntese de matriz
14 extracelular (Martinez & Gordon, 2014).

15 Durante a embriogênese, macrófagos se originam de células
16 precursoras presentes no saco vitelínico e no fígado fetal (Fig. 3) (Gordon &
17 Plüddemann, 2017). Durante a fase adulta do animal, os macrófagos são
18 oriundos de células-tronco pluripotentes hematopoiéticas presentes na medula
19 óssea (Gordon & Plüddemann, 2017). Durante a embriogênese de animais
20 vertebrados, as células precursoras provêm do mesoderma e se diferenciam
21 em progenitores eritro-mieloides no fígado fetal (Lazarov *et al.*, 2023). A partir
22 destas células originam os precursores de macrófagos no fígado (Lazarov *et*
23 *al.*, 2023). Estes, por sua vez, colonizam todo o embrião e se diferenciam em
24 macrófagos residentes teciduais. O processo de diferenciação de precursores
25 de macrófagos para macrófagos residentes teciduais é dependente dos
26 estímulos do microambiente. Estes estímulos desencadeiam a expressão de
27 fatores de transcrição, induzindo a fenotipagem tecido-específico dos
28 macrófagos residentes (Lazarov *et al.*, 2023). Na fase adulta, os macrófagos
29 residentes de origem embrionária se mantêm no tecido por autorrenovação e
30 parte dos macrófagos residentes são oriundos de células precursoras
31 pluripotentes hematopoiéticas da medula óssea (Lazarov *et al.*, 2023). Este
32 processo é mediado por sinais teciduais que induzem a migração de monócitos
33 para os tecidos específicos (Lazarov *et al.*, 2023).

34

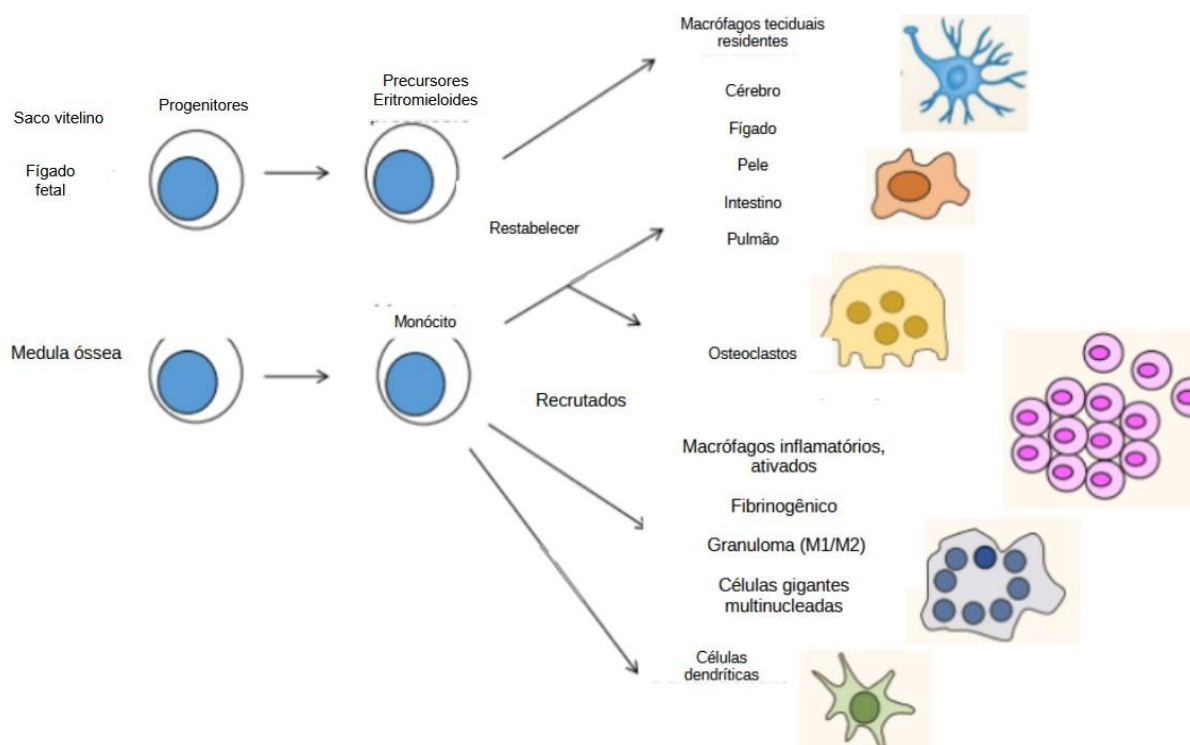


Figura 3. Origem dos macrófagos residentes teciduais. Macrófagos são derivados de células precursoras embrionárias oriunda do saco vitelínico ou fígado fetal (no desenvolvimento embrionário) e originário de monócitos provindo da medula óssea (vertebrados adultos). Conforme o tipo de tecido que se estabelecem, os macrófagos apresentam diferenças fenotípicas. A maioria dos macrófagos residentes provém de células precursoras e a outra parte provém de monócitos (Traduzido de Gordon & Pluddemann, 2017).

1

2 A cavidade peritoneal de mamíferos é um compartimento com várias
 3 células do sistema imune que estabelecem interações (Cassado *et al.*, 2015).
 4 Em condições de homeostase, há duas subpopulações de macrófagos
 5 peritoneais residentes (MORes): *Large Peritoneal Macrophage* (LPM) e *Small*
 6 *Peritoneal Macrophage* (SPM) (Fig. 4) (Ghosn *et al.*, 2010). Essas
 7 subpopulações diferenciam-se na origem, morfologia e expressão de
 8 receptores (Ghosn *et al.*, 2010).

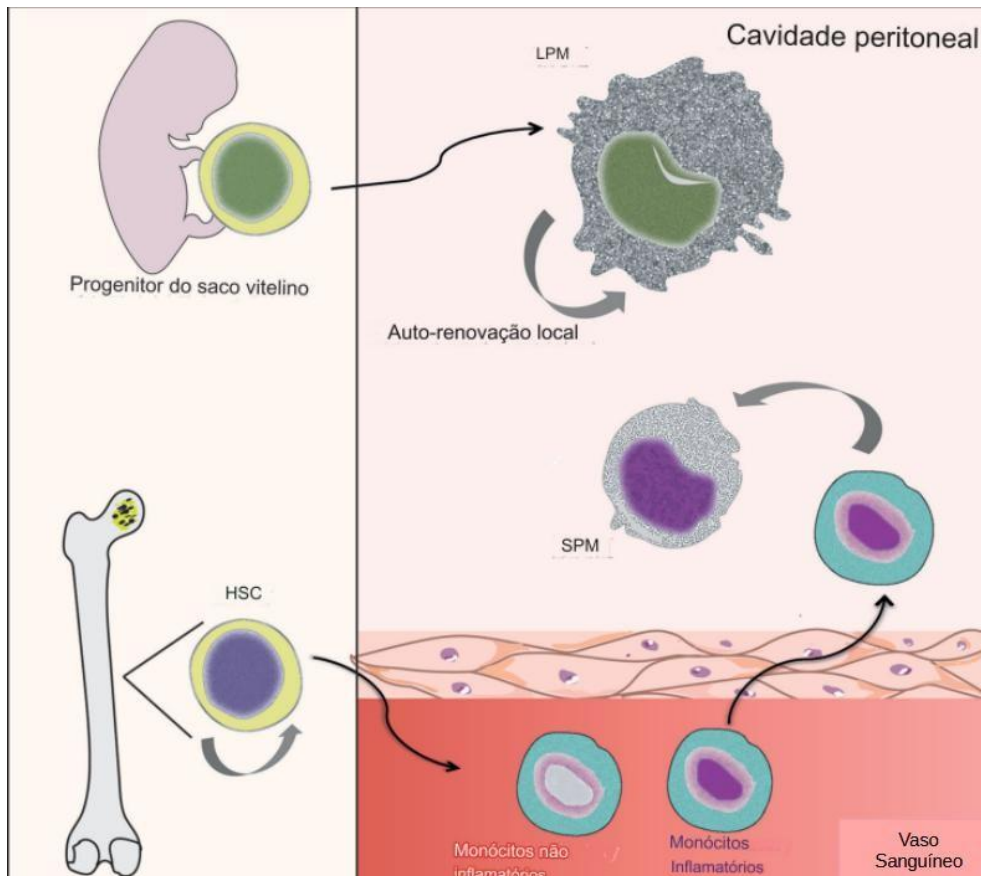


Figura 4. Origem das subpopulações de macrófagos peritoneais de camundongos. Subpopulação macrófago peritoneal grande (LPM) origina de células progenitoras do saco vitelínico, mantendo-se no peritônio por autorrenovação, enquanto macrófago peritoneal pequeno (SPM) provém e é restabelecido por monócitos circulantes, oriundos de células tronco hematopoiéticas da medula óssea (Traduzido de Cassado *et al.*, 2015).

1

2 A subpopulação LPM é oriunda de células precursoras do saco vitelínico
 3 e fígado fetal que se desenvolveram a partir do estímulo da cavidade peritoneal
 4 mediado pelo ácido retinóico, induzindo a expressão do fator de transcrição
 5 GATA6 (Lazarov *et al.*, 2023). A subpopulação LPM corresponde à 90% da
 6 população de macrófagos residentes do peritônio, possui alta expressão de
 7 F4/80 (proteína que atravessa a membrana plasmática 7 vezes); e baixa
 8 expressão de complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC
 9 classe II) (LPM F4/80+ MHC II-) (Cassado *et al.*, 2015). Além disso, a LPM
 10 possui maior longevidade, durando cerca de 14 dias e com capacidade de
 11 autorrenovação (Accarias *et al.*, 2016; Cassado *et al.*, 2011).

12 A subpopulação SPM de macrófagos peritoneais residentes é oriunda de
 13 monócitos circulantes que se originam da medula óssea (Ghosn *et al.*, 2010). A
 14 subpopulação SPM é menor em tamanho, constituem cerca de 10% da

1 população residente e possui baixa expressão de F4/80 e alta expressão de
2 MHC de classe II (SPM F4/80- MHC II+) (Cassado *et al.*, 2015). A longevidade
3 dessa subpopulação é menor do que a de LPM, com a duração de 3 a 5 dias,
4 sendo restabelecida por monócitos (Cassado *et al.*, 2011). Neste trabalho,
5 estas subpopulações de macrófagos de peritônio em homeostase serão
6 denominadas como macrófagos peritoneais residentes (MORes).

7 Num processo inflamatório, ocorre o desaparecimento de LPM e SPM
8 residentes (Accarias *et al.*, 2016). Os LPMs migram para o omento, numa
9 região denominada *milky spots* (Cassado *et al.*, 2015). Omento é uma estrutura
10 que conecta órgãos do abdômen no qual possui alta expressão de Raldh2 que
11 participa na síntese de ácido retinóico e induz a atividade do fator GATA6
12 (Okabe & Medzhitov, 2014). Nas primeiras 12 h de inflamação, ocorre o
13 desaparecimento de SPMs (Accarias *et al.*, 2016). Após 24 h, ocorre o aumento
14 da subpopulação de SPMs inflamatórios e monócitos inflamatórios (Fig. 5).
15 Porém, não se sabe ao certo se ocorre depleção de SPMs e são restabelecidos
16 por monócitos inflamatórios ou se ocorre uma explosão proliferativa de SPMs
17 residentes apresentando perfil microbicida (Accarias *et al.*, 2016). Esses tipos
18 de macrófagos oriundos de um processo inflamatório serão denominados no
19 presente trabalho como macrófagos peritoneais estimulados (MOEst).

20 Monócitos são células presentes em todos os vertebrados (Mildner *et al.*,
21 2016). Em condições normais, os monócitos de camundongos se dividem em
22 dois subtipos: monócitos Ly6C^{high} e CCR2+ (“monócitos inflamatórios” ou
23 “clássicos”) e monócitos Ly6C^{low} e CCR2- (“monócitos alternativos” ou “não
24 clássicos”) (Mitchell *et al.*, 2014). Os monócitos Ly6C^{high} são precursores de
25 monócitos Ly6C^{low} (Mitchell *et al.*, 2014). Na monopoese, há a geração de
26 monócitos Ly6C^{high} a partir das células progenitoras mielóide comum na medula
27 óssea (Wolf *et al.*, 2019). Essa subpopulação de monócitos passa por
28 diferentes vias: pode perder a expressão de Ly6C^{high} e passar a ser monócitos
29 Ly6C^{low} e permanecer na medula óssea; ou continuar expressando Ly6C^{high} e
30 migrar para a corrente sanguínea (Mildner *et al.*, 2016). Monócitos Ly6C^{high} são
31 capazes de atravessar os vasos sanguíneos e restabelecer parte dos
32 macrófagos residentes (Mildner *et al.*, 2016). Na corrente sanguínea, os
33 monócitos podem diminuir a expressão de Ly6C, diferenciando em monócitos
34 Ly6C^{low} (Mitchell *et al.*, 2014). Monócitos Ly6C^{low} circulam na corrente

1 sanguínea “patrulhando” a região do endotélio e, assim, eliminam debris
2 celulares e possíveis patógenos (Mitchell *et al.*, 2014). Num processo
3 inflamatório, os monócitos Ly6C^{high} entram nos tecidos. Esses monócitos
4 possuem alta capacidade microbicida (Mitchell *et al.*, 2014).
5

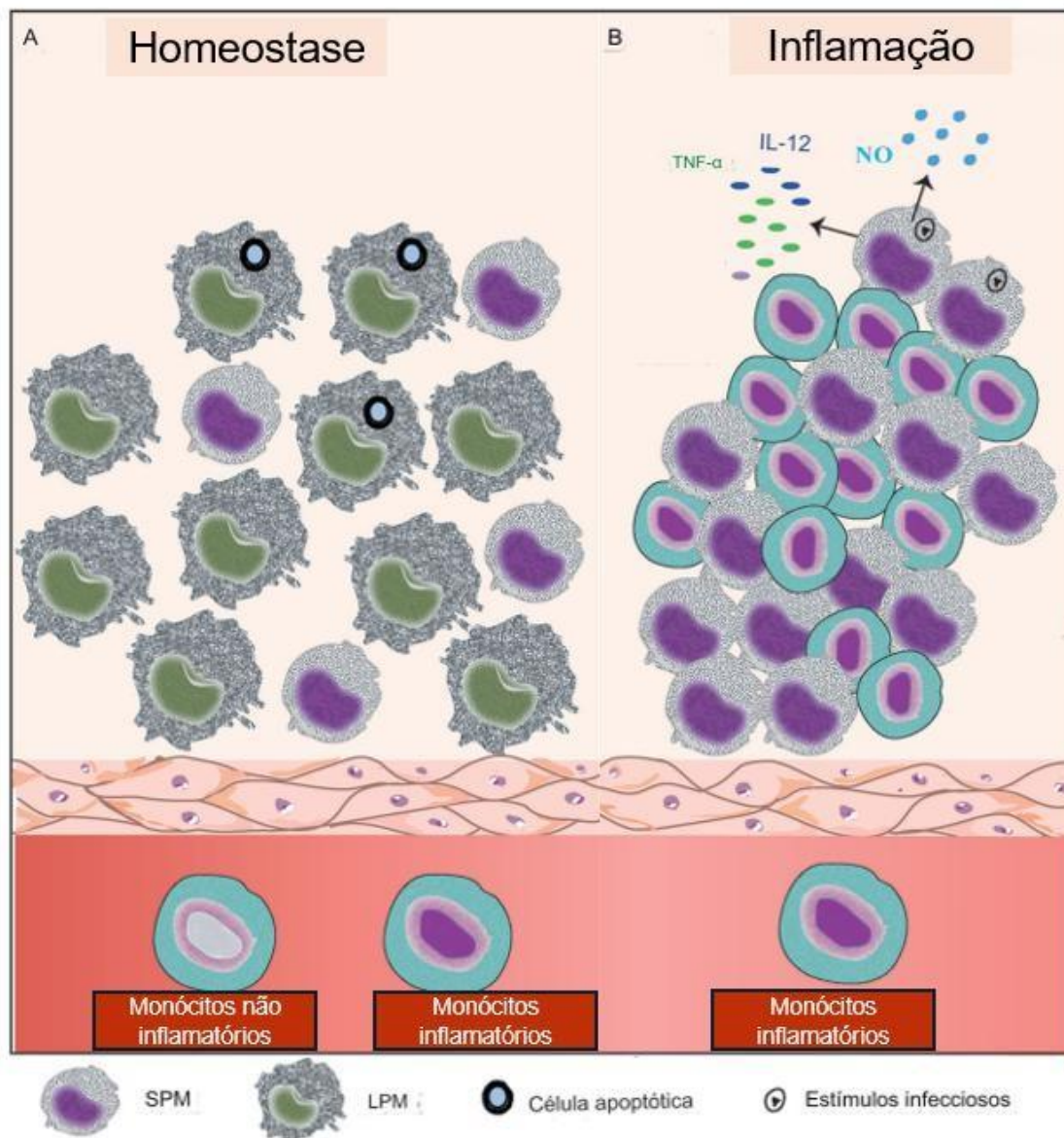


Figura 5. Microambiente peritoneal em condições de homeostasia e em microambiente inflamado. Em homeostase, os macrófagos residentes do peritônio são LPM (mais abundante) e SPM (menos abundante) e monócitos clássicos (inflamatórios) e monócitos alternativos (não inflamatórios) que circulam pela corrente sanguínea. Em microambiente inflamado, ocorre influxo de monócitos clássicos, aumento da subpopulação SPM e migração da subpopulação LPM, auxiliando as células B a produzirem IgA (Traduzido e modificado de Cassado *et al.*, 2015)

6

1 Macrófagos e monócitos podem ser induzidos a perfil inflamatório (M1),
2 responsável pelo controle de patógenos, a partir de estímulos como IFN- γ e
3 lipopolissacarídeo (LPS) como abordado anteriormente.

4 O LPS é uma molécula constituinte de paredes celulares bactérias gram-
5 negativas. Essa molécula é reconhecida por receptores de reconhecimento de
6 padrões moleculares (PRRs) presentes nos macrófagos (Taylor *et al.*, 2005).
7 Um desses PRRs é *Toll-like receptor 4* (TLR4) (Fig. 6) (Taylor *et al.*, 2005).
8 Quando TLR4 reconhece LPS, desencadeia uma cascata de sinalização
9 intracelular mediada por moléculas adaptadoras como MYD88 e TRAF6 que
10 induzem a fosforilação do inibidor κ B kinase (iKK) (Cinelli *et al.*, 2020). Após a
11 fosforilação de iKK, ocorre a fosforilação em cascata do inibidor κ B (IKB), que
12 se desassocia do Fator Nuclear- κ B (NF- κ B). iKK é degradado no citosol e o
13 NF- κ B é translocado para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes
14 relacionados à inflamação (Cinelli *et al.*, 2020).

15 IFN- γ participa de outra via de sinalização (Fig. 6) (Cinelli *et al.*, 2020).
16 IFN- γ é reconhecido pelo receptor de IFN- γ , proteína heterodimérica, IFN- γ R1
17 e IFN- γ R2, que desencadeia sinalização intracelular ativando Janus kinase
18 (JAK). JAK fosforila STAT-1 α o qual dimeriza e se transloca para o núcleo da
19 célula. STAT-1 α induz expressão de Fator Regulador de Interferon-1 (IRF-1),
20 que se liga à região promotora de genes relacionados à inflamação (Cinelli *et*
21 *al.*, 2020).

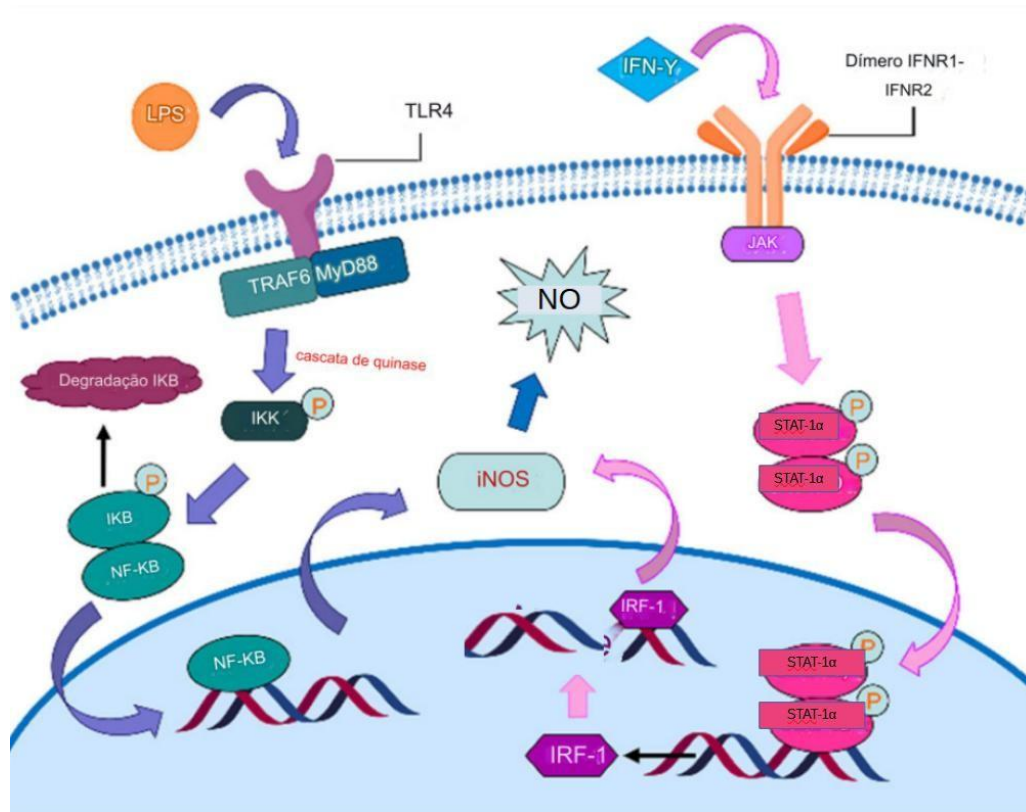


Figura 6. Cascatas de sinalização da ativação de iNOS a partir do estímulo de LPS e IFN- γ . LPS é reconhecido pelo receptor *Toll-like receptor 4* (TLR4) que através de moléculas adaptadoras do receptor - fator estimulador de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF6) e resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MYD88), induzem cascata de fosforilação via NF- κ B que desacopla de seu inibidor e migra para o núcleo, onde se liga à região promotora do gene da iNOS. IFN- γ é reconhecido pelo seu receptor IFNR, que através de Janus Kinase (JAK) fosforila STAT-1 α . Esta molécula dimeriza e migra para o núcleo, onde se liga a região promotora do gene Fator Regulatório de Interferon-1 (IRF-1), capaz de se ligar à região promotora do gene da iNOS. Após a expressão de iNOS, ocorre a síntese de NO. (Traduzido de Cinelli *et al.*, 2020).

1

2 Macrófagos M1 possuem alta atividade glicolítica mesmo na presença
 3 de oxigênio, processo denominado efeito Warburg. Na glicólise aeróbica
 4 utilizam intermediários da via glicolítica como mediadores na síntese de
 5 moléculas microbidas (Viola *et al.*, 2019). A via das pentoses fosfatos (via
 6 derivada da via glicolítica) utiliza glicose-6-fosfato como substrato e sintetiza
 7 nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e outros
 8 açúcares (Viola *et al.*, 2019).

9 IFN- γ e LPS induzem sinalização intracelular e expressão de genes
 10 relacionados a inflamação em macrófagos; um desses genes é o da enzima
 11 óxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma enzima pertencente à família das
 12 NOS que sintetiza óxido nítrico (NO) e L-citrulina pela oxidação de L-arginina
 13 (Cinelli *et al.*, 2020). iNOS é expressa de forma induzível, independente de

1 cálcio e o NO produzido é em escala micromolar com alta função microbicida
 2 (Cinelli *et al.*, 2020). Esse mecanismo é o que se caracteriza como “sistema
 3 microbicida de NO”. A iNOS é uma holoenzima homodimérica, cujos dímeros
 4 possuem dois domínios: domínio redutase e domínio oxidase. No domínio
 5 redutase, ocorre oxirredução das moléculas nicotinamida adenina dinucleotídeo
 6 fosfato, flavina adenina dinucleotídeo e flavina mononucleotídeo, enquanto no
 7 domínio oxidase ocorre oxidação de L-arginina mediada por
 8 tetrahydrobiopterina (BH₄), grupamento heme, calmodulina e oxigênio molecular
 9 (Minhas *et al.*, 2020). O mecanismo de produção de NO ocorre de um dímero
 10 para o outro (Minhas *et al.*, 2020) de forma intra e inter cadeias proteicas
 11 transportadoras de elétrons (Minhas *et al.*, 2020). Este processo é dependente
 12 da presença de NADPH. Dessa forma, na reprogramação metabólica,
 13 macrófagos apresentam intensa atividade glicolítica crucial para geração de
 14 NADPH, o qual se liga à região redutase da enzima e transfere elétrons ao FAD
 15 que se converte em FADH₂ e posteriormente reduz FMN, formando FMNH.
 16 Sobre o efeito da calmodulina, a enzima se rearranja espacialmente de forma
 17 que FMNH reage com o grupamento heme do outro dímero da enzima. FMNH
 18 reduz o grupamento heme de ferro III para ferro II. Assim, com o auxílio da BH₄,
 19 a reação do grupamento heme com o oxigênio molecular gera a produção de
 20 NO e L-citrulina através da oxidação de L-arginina (Fig. 7) (Minhas *et al.*, 2020).
 21

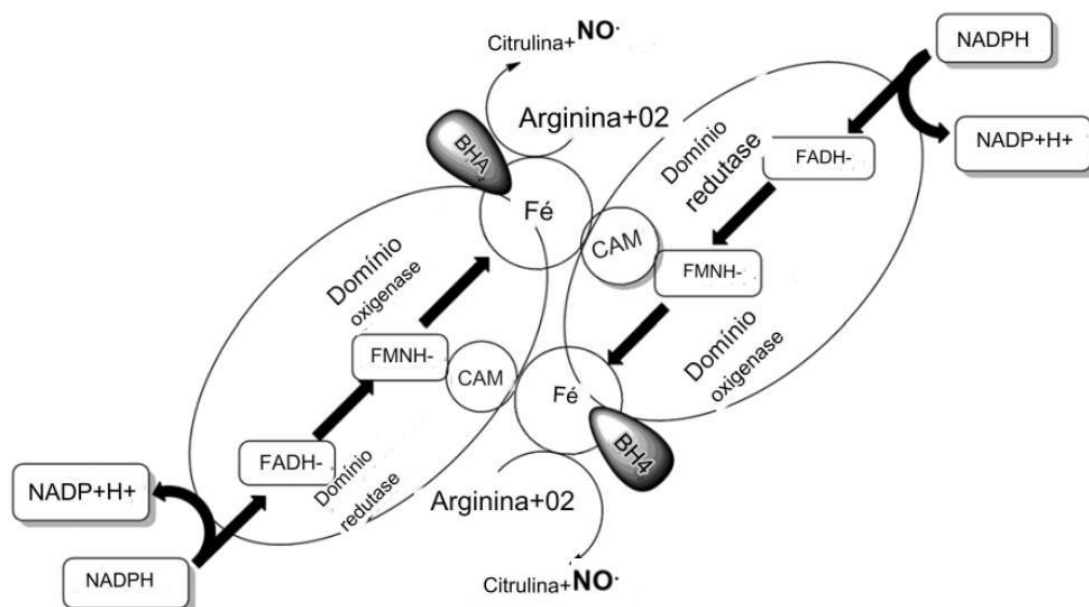


Figura 7. Esquematisação dos domínios da enzima homodimérica iNOS. Cada dímero possui um domínio redutase (NAD, FAD, FMN) e um domínio oxidase (BH4, Heme e calmodulina). O processo de produção de NO é exercido de um dímero para outro (Traduzido de Minhas *et al.*, 2020).

1

2 Para a produção de NO, iNOS compete com a enzima arginase
3 (responsável por sintetizar ureia e L-ornitina) pelo substrato L-arginina (Canè *et*
4 *al.*, 2025). L-arginina é um aminoácido catiônico semiessencial que entra na
5 célula através de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT), sendo
6 CAT2 um importante transportador de L-arginina em macrófagos M1 (Canè *et*
7 *al.*, 2025; Thompson *et al.*, 2008). A atividade de CAT2 regula a disponibilidade
8 do substrato da enzima iNOS. O papel de CAT2 é crucial na otimização da
9 produção de NO contra patógenos intracelulares. Camundongos *knockout* para
10 CAT2 demonstraram maior suscetibilidade a infecções por *T. gondii* por menor
11 produção de NO (Thompson *et al.*, 2008).

12 L-citrulina pode ser convertida para arginina através da enzima
13 argininosuccinato sintase, contribuindo na geração de mais substrato que pode
14 ser utilizado pela arginase-1 na produção de poliaminas ou pela iNOS na
15 produção de NO (Minhas *et al.*, 2020).

16 NO é um gás instável que possui curto tempo de vida (Minhas *et al.*,
17 2020). Em concentração micromolar são citotóxicos (Minhas *et al.*, 2020). NO
18 reage com o meio aquoso e forma nitrito e nitrato ou reage com estruturas
19 celulares, causando sua destruição ou disfunção (Phaniendra *et al.*, 2015).
20 Além disso, NO pode reagir com espécies reativas de oxigênio (ROS) como
21 superóxidos, e formar peroxinitrito, uma molécula muito reativa e danosa
22 (Phaniendra *et al.*, 2015).

23 Macrófagos M1 passam a produzir mais ROS pela maior expressão de
24 NADPH-oxidase e produzem moléculas relacionadas a imunidade autônoma da
25 célula como duas subfamílias de GTPases induzíveis por IFN: *immunity related*
26 *GTPases* (IRGs) e *guanylate binding proteins* (GBPs). IRGs e GBPs participam
27 do controle da proliferação de parasitos intracelulares como *T. gondii* ligando-se
28 ao VP (Saeij & frickel, 2017).

29

30 2.2. INTERAÇÃO DE *Toxoplasma gondii* e MACRÓFAGO

1 Quando *T. gondii* infecta o hospedeiro, os macrófagos o reconhecem,
2 fagocitam e tentam controlar a proliferação do parasito através de mecanismos
3 microbicidas como a produção de NO (ShapouriMoghaddam *et al.*, 2018). Após
4 o reconhecimento, macrófagos fagocitam o parasito formando uma estrutura
5 denominada fagossomo que se funde com os lisossomos, formando os
6 fagolisossomos. Estes fagolisossomos contêm moléculas altamente reativas
7 que destroem o parasito. Nos fagolisossomos se encontra o MHC de classe II
8 que reconhece antígenos proteicos derivados da degradação do parasito e os
9 apresenta aos linfócitos T *helpers*. Os macrófagos microbicidas passam a
10 expressar iNOS e produzir NO (Minhas *et al.*, 2020). Esse gás reage com
11 outras moléculas como superóxidos, formando peroxinitrito, um agente
12 citotóxico capaz de controlar a replicação do parasito (Minhas *et al.*, 2020).
13 Quando o parasito invade ativamente os macrófagos de camundongos e forma
14 o vacúolo parasitóforo, um dos mecanismos microbicidas da imunidade
15 autônoma da célula envolve GBPs e IRGs que se ligam e polimerizam no
16 vacúolo parasitóforo. A partir disso, ocorre a nitração direcionada ao vacúolo
17 parasitóforo, causando o colapso da rede interna vacuolar e a destruição do
18 parasito (Zhao *et al.*, 2024).

19 Porém, cepas tipo I (virulentas) de *T. gondii*, como RH, secretam
20 proteínas de rotrias e grânulos densos, principalmente ROP5, ROP17, ROP18
21 e GRA7 que formam complexo na face citoplasmática do VP que impede a
22 ligação e polimerização de GBPs e IRGs, mantendo a integridade do VP e
23 sobrevivência do parasito (Ihara & Nishikawa, 2025). Em contraste, cepas do
24 tipo II (avirulentas) possuem polimorfismo nessas proteínas que as tornam
25 ineficazes em impedir a ligação de GBPs e IRGs ao VP. Dessa forma, IRGs e
26 GBPs se ligam e oligomerizam na membrana do VP, levando a destruição do
27 parasito (Ihara & Nishikawa, 2025). Além disso, foi demonstrado que o parasito
28 modula este sistema microbicida, diminuindo parcialmente a produção de NO
29 (Seabra *et al.*, 2002). Macrófagos residentes peritoneais de camundongos, 24 h
30 antes ou imediatamente ativados para o perfil M1, apresentam inibição da
31 produção de NO e redução da expressão de iNOS quando infectados com *T.*
32 *gondii* (Seabra *et al.*, 2002). Um possível mecanismo de evasão proposto ao
33 parasito contra NO está relacionado com a exposição de fosfatidilserina (PS)
34 na membrana plasmática do parasito (Seabra *et al.*, 2004). A PS é um tipo de

1 fosfolipídio presente em membranas celulares e células viáveis apresentam PS
2 voltada para o meio citosólico, enquanto células apoptóticas expõe PS para o
3 meio extracelular, sendo reconhecida por receptores presentes nos
4 macrófagos. Parte da população de *T. gondii* expõe PS (Seabra *et al.*, 2004;
5 Santos *et al.*, 2011). A infecção por *T. gondii* em macrófagos peritoneais
6 residentes ativados no perfil M1, leva a produção de TGF- β que induz a
7 degradação de iNOS via proteassoma e, conseqüentemente, a inibição da
8 produção de NO (Seabra *et al.*, 2004; Padrão *et al.*, 2014). A exposição da PS
9 (PS+) está presente em 50% da população de taquizoíto de *T. gondii*, enquanto
10 os outros 50% não expõe PS (PS-) (Seabra *et al.*, 2004). O balanceamento das
11 populações PS+ e PS- é importante para manter o hospedeiro vivo (Santos *et al.*,
12 2011). A exposição de PS é realizada também por outros parasitos como
13 *Leishmania* spp., processo que ficou denominado como mimetismo apoptótico
14 (Wanderley *et al.*, 2020).

15 Foi demonstrado que a cepa RH de *T. gondii* inibe a produção de NO de
16 forma diferente conforme o tipo de macrófago infectado (Cabral *et al.*, 2018). A
17 linhagem estabelecida de macrófagos J774-A1 apresenta inibição de NO
18 atrelada a redução da expressão de iNOS. Em macrófagos RAW 264.7
19 também ocorre inibição de NO, porém iNOS continua sendo expressa. O
20 mecanismo de inibição da produção de NO é diferente dependendo da
21 linhagem de macrófagos, com a degradação ou não de iNOS. Como
22 macrófagos J774-A1 são filogeneticamente mais próximos de macrófagos
23 peritoneais do que RAW 264.7 (Lindmark *et al.*, 2004), e macrófagos
24 peritoneais também ocorre a degradação da iNOS, foi proposto que a origem
25 dos macrófagos poderia explicar a diferença no mecanismo de inibição da
26 síntese de NO (Cabral *et al.*, 2018).

27 Além disso, a inibição da produção de NO ocorre independentemente do
28 tipo de cepa. Apesar de cepas pouco virulentas ou avirulentas do tipo II e III
29 como ME-49 e VEG serem destruídas, estas são capazes de inibir a produção
30 de NO nas primeiras 24 h de infecção, embora ocorra maior produção de NO
31 após 48 h de interação (Damasceno-Sá *et al.*, 2021).

32 Para melhor entendimento do mecanismo evasivo de *T. gondii* ao
33 sistema microbicida envolvendo NO, é necessário compreender se as cepas do
34 parasito, menos e mais virulentas, utilizam mecanismos distintos na inibição da

1 síntese de NO, com a modulação da expressão de iNOS nos diferentes
2 macrófagos peritoneais. É necessário compreender também se os parasitos de
3 ambas as cepas invadem e se proliferam da mesma forma nos diferentes tipos
4 de macrófagos peritoneais.

5 Para verificar se a inibição da síntese de NO ocorre pela degradação de
6 iNOS nos diferentes tipos de macrófagos de cultura primária, se há população
7 específica em que o parasito invade e se ocorre proliferação em macrófagos de
8 cultura primária, dois tipos de macrófagos peritoneais de camundongos foram
9 selecionados e infectados com taquizoítos de *T. gondii* cepa RH (virulenta) e
10 ME-49 (avirulenta). Para isso, macrófagos de camundongos sadios -
11 macrófagos peritoneais residentes (MORes), e macrófagos de camundongos
12 com peritonite causada por baixo inóculo de *T. gondii* cepa ME-49 - macrófagos
13 peritoneais estimulados (MOEst), foram utilizados no presente trabalho.

14

15 **3. OBJETIVOS**

16 3.1. OBJETIVO GERAL

17 Avaliar se a inibição de NO ocorre pela modulação da expressão de
18 iNOS em dois tipos de macrófagos peritoneais infectados com *Toxoplasma*
19 *gondii* das cepas RH ou ME-49.

20

21 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

22 - Avaliar a produção de NO em macrófagos peritoneais residentes e
23 estimulados após a infecção com *T. gondii* cepa RH ou ME-49;

24 - Avaliar a expressão de iNOS em macrófagos peritoneais residentes e
25 estimulados infectados com *T. gondii* de ambas as cepas;

26 - Avaliar o índice de infectividade das diferentes cepas nos diferentes tipos de
27 macrófagos peritoneais.

28

29 **4. METODOLOGIA**

30

31 4.1. MANUTENÇÃO DE *Toxoplasma gondii* CEPA ME-49

32 Bradizoítos da cepa ME-49 foram mantidos em cérebros de
33 camundongos suíços. Com 3 meses de infecção, o cérebro foi macerado. O
34 macerado diluído em Tampão Fosfato Salino (PBS) foi inoculado no peritônio

1 de camundongos. Após 5 a 7 dias foi realizado lavado peritoneal para obtenção
2 de taquizoítos e infecção de LLC-MK2. Estas células foram cultivadas em meio
3 *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 5% de soro fetal bovino (SFB)
4 com troca de meio rotineira de 2 ou 3 dias e passagem realizada para outra
5 garrafa contendo LLC-MK2 a cada 5 – 7 dias de infecção (Damasceno-Sá *et*
6 *al.*, 2021 com adaptações). Após 5 dias de infecção, as células foram rompidas
7 com *scraper* e vários jateamentos utilizando seringas com agulha 21G e
8 filtradas com membrana de 3 µm. Parasitos foram centrifugados em 1000 x g à
9 4°C por 15 min e ressuspensos em DMEM e quantificados para estímulo
10 inflamatório nos camundongos ou para interagir com macrófagos (Damasceno-
11 Sá *et al.*, 2021 com adaptações). Esse projeto foi aprovado na CEUA da UENF,
12 protocolo 514 de 10/2022.

13

14

15 4.2. MANUTENÇÃO DE *Toxoplasma gondii* CEPA RH

16 Taquizoítos de *T. gondii* cepa RH foram obtidos e mantidos por
17 passagem rotineira por lavado peritoneal a cada 2 ou 3 dias em camundongos
18 suíços de 3 a 4 semanas. O parasito foi obtido por lavado peritoneal com 5 mL
19 de *phosphate buffered saline* (PBS) à 4°C, centrifugado à 1000 X g à 4°C por
20 15 min, ressuspeso em DMEM e usado nos experimentos.

21

22 4.3. OBTENÇÃO, CULTIVO E ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS 23 RESIDENTES E ESTIMULADOS

24 Macrófagos peritoneais residentes (MORes) foram obtidos por lavado
25 peritoneal com PBS em camundongos suíços. Para macrófagos peritoneais
26 estimulados (MOEst), taquizoítos da cepa ME-49 foram ressuspensos em
27 DMEM, quantificados e 200 taquizoítos inoculados em cada camundongo
28 suíço. Após 4 dias, esses macrófagos “estimulados” foram obtidos por lavado
29 peritoneal (Dunay *et al.*, 2008). As células de ambos os lavados foram
30 centrifugadas em 500 x g a 4°C por 10 min, ressuspensas em DMEM,
31 quantificadas e cultivadas (Seabra *et al.*, 2002). MORes e MOEst foram
32 cultivados em placas de 6 poços ou 24 poços, neste último sobre lamínulas de
33 vidro, à 37°C com 5% de CO₂. Após 2 h de adesão, as células não aderentes
34 foram retiradas com PBS à 37°C e os macrófagos foram cultivados em DMEM

1 com 10% de SFB, 1% de streptomicina + penicilina e ativados com 20 ng/mL
2 de IFN- γ e 200 ng/mL de LPS por 24 h (Cabral *et al.*, 2018).

3 4 5 6 4.4. INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS E *Toxoplasma gondii* DA CEPA ME-49 E 7 RH

8 Macrófagos ativados foram infectados por *T. gondii* (cepas RH ou ME-
9 49) na proporção 5:1 (parasito:macrófago) por 2 e 24 h. Após 2 h, os poços
10 foram lavados para retirar parasitos que não entraram neste período.
11 Macrófagos de 2 h de infecção foram fixados ou soltos (dependendo da
12 análise). Macrófagos de 24 h de infecção foram reativados com DMEM, 10%
13 de SFB, 20 ng/mL IFN- γ e 200 ng/mL LPS e após 24 h foi realizado o mesmo
14 procedimento do grupo de 2 h (Cabral *et al.*, 2018).

15 16 4.5. DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

17 A produção de NO foi avaliada indiretamente pela medida de nitrito
18 presente no meio através do reagente de Griess. Depois das interações com os
19 parasitos, 50 μ l do sobrenadante de cada poço foi misturado com 50 μ l de
20 reagente de Griess (proporção 1:1) em placa de 96 poços. Foi feita a leitura no
21 espectrofotômetro (*VERSAmax. Molecular Devices*) em comprimento de onda
22 de 540 nm de absorbância. A concentração de nitrito foi calculada a partir da
23 curva padrão usando nitrito de sódio diluído em DMEM (Seabra *et al.*, 2002).

24 25 4.6. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

26 Macrófagos cultivados em 24 poços sobre lamínulas e infectados por 2 e
27 24 h foram fixados por 30 min com PBS contendo 4% de formaldeído e
28 permeabilizados com PBS com 2% de Triton x-100 por 10 min. As células
29 foram lavadas, incubadas por 15 min com PBS com 3% de soro de albumina
30 bovina (PBS-BSA) e incubadas por 1 h com anticorpo anti-iNOS de coelho
31 (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:200 em PBS-BSA e com anticorpo anti-*T.*
32 *gondii* de camundongo (soro de camundongos cronicamente infectados). As
33 células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho Alexa
34 Fluor 488 (Sigma-Aldrich) (1:400) e anti-camundongo-TRITC (Thermo Fisher

1 Scientific) (1:1000) por 1 h, foram lavadas com PBS-BSA 3%, colocadas em
2 lâminas com Prolong Gold conjugado com DAPI (Invitrogen) e observadas no
3 microscópio de fluorescência (Axioplan, ZEISS). Células foram quantificadas a
4 partir da expressão de iNOS, sendo classificadas em células que expressam
5 iNOS (iNOS+) ou células que não expressam iNOS (iNOS-) com ou sem
6 parasito (Cabral *et al.*, 2018 com adaptações).

7 4.7. SOLTURA E VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS

8 MORes foram obtidos por lavado peritoneal, plaqueados em placas de 6
9 poços, ativados com IFN-gamma e LPS por 24 h e cultivados em estufa à
10 37°C. Após 24 h de ativação, MORes foram transferidos para banho de gelo à
11 4°C utilizando solução de PBS, ou PBS com EDTA (a 0,5; 1 ou 3%) por 20 min;
12 ou foram utilizados PBS ou PBS e remoção mecânica das células com êmbolo
13 de seringa à 4°C por 40 min para teste de recuperação das células.
14 Selecionado o método de soltura PBS ou PBS com êmbolo da seringa, MORes
15 foram incubados com 1 µL de iodeto de propídio em 500 µL de PBS (protocolo
16 estabelecido pelo grupo baseado em Chen *et al.*, 2015).

17

18 4.8. CITOMETRIA DE FLUXO

19 Antes da interação, os parasitos foram incubados por 30 min com
20 *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE), marcador que emite
21 fluorescência após ação de enzimas esterases e que incorpora no DNA.
22 Macrófagos plaqueados em placas de 6 poços e infectados por 2 e 24 h foram
23 soltos utilizando PBS à 4°C durante 40 min (protocolo estabelecido pelo grupo).
24 As células foram fixadas por 30 min em PBS contendo 4% de formaldeído,
25 permeabilizadas com 1% de Triton X-100 por 10 min e incubadas com
26 FcBlocker CD14/CD16 por 5 minutos em temperatura ambiente. Após o
27 bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo anti-iNOS conjugado com
28 PE (0,3:100µL para cada 1×10^6 células) por 1 h e avaliadas por citometria de
29 fluxo (*SymphonyA1*, BD).

30

31 5. RESULTADOS

32 5. 1. PRODUÇÃO DE NO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES

33 INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii* CEPAS RH E ME-49

1 Após 24 h de interação, foi observado que a produção de NO relativa de
2 MORes infectados com a cepa RH diminuiu cerca de 50% em relação ao
3 controle (Fig. 8A). Porém, quando infectado com a cepa ME-49 a produção
4 relativa de NO não alterou (Fig. 8B). Isso demonstra que apenas a cepa RH
5 diminuiu a produção de NO neste tipo de macrófago.

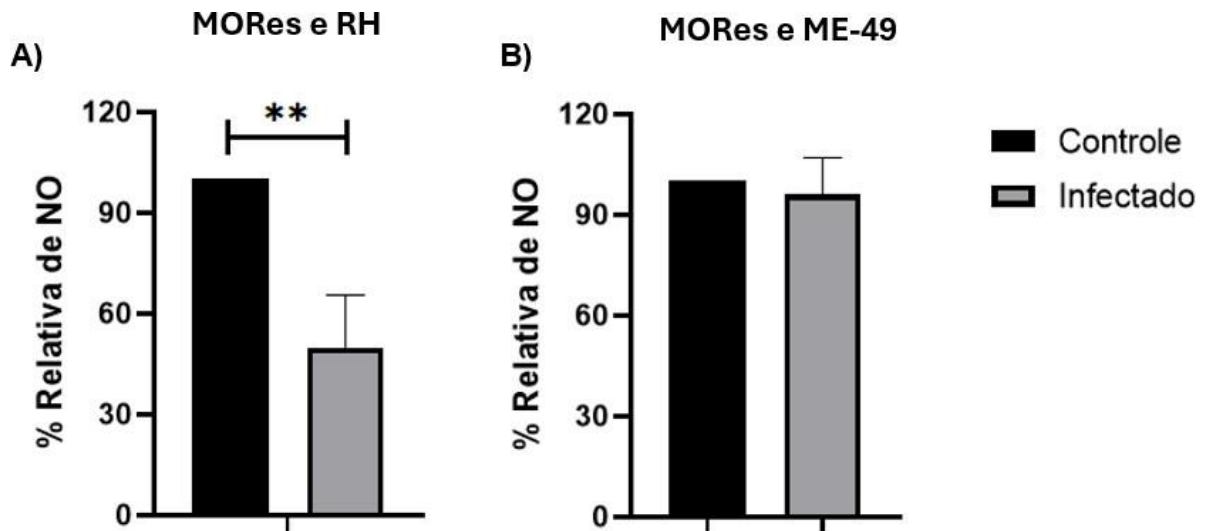


Figura 8. Porcentagem relativa da produção de NO de macrófagos peritoneais residentes (MORes). MORes não infectados (controle - coluna preta) e infectados (coluna cinza) com *Toxoplasma gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (B) (n = 5 experimentos independentes). Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t ** $P < 0,01$).

6

7 5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iNOS POR MICROSCOPIA DE 8 FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES 9 INFECTADOS COM AS CEPAS RH E ME-49

10 Para verificar se a redução na produção de NO ocorria pela diminuição
11 da expressão da enzima iNOS, foi verificado a expressão de iNOS por
12 microscopia de fluorescência de forma qualitativa e quantitativa, separando as
13 populações que expressam iNOS (iNOS+) e que não expressam iNOS (iNOS-)
14 em 2 h ou 24 h de interação com a cepa RH ou ME-49. De forma qualitativa, foi
15 observado que poucos MORes do grupo não interagido (controle) expressaram
16 iNOS, demonstrando que essa população de macrófagos peritoneais
17 residentes é heterogênea com subpopulações mais responsáveis aos
18 ativadores (LPS e IFN- γ) (Fig. 9A). Nos grupos infectados, foi observado que,
19 após 24 h de interação, a cepa RH se multiplicou e houve diminuição abrupta
20 de subpopulações iNOS+. Em relação aos MORes infectados com a cepa ME-

1 49, observou-se que após 24 h de interação, o parasito é destruído e a
2 quantidade de MORes iNOS+ foi parecida com o grupo controle.

3 Para confirmar os dados, fizemos análise quantitativa da relação em
4 porcentagem de macrófagos não interagido e interagidos durante 2 e 24 h de
5 exposição. O grupo interagido foi separado em macrófagos com parasitos
6 internalizados e macrófagos sem parasitos internalizados, a fim de verificar se
7 o parasito modula a expressão de iNOS de forma parácrina (Fig. 9B). Em 2 h
8 de infecção, observamos que o grupo controle apresentou cerca de 25% de
9 células iNOS+, assim como os grupos interagidos com *T. gondii*, tanto com a
10 cepa RH quanto com ME-49, apresentaram aproximadamente a mesma
11 quantidade de células iNOS+ com parasito internalizado ou não. Após 24 h de
12 interação, a porcentagem de macrófagos iNOS+ diminuiu no grupo interagido
13 com a cepa RH em populações com o parasito internalizado e populações que
14 não tinham o parasito internalizado, demonstrando que o parasito modula a
15 expressão de iNOS no macrófago infectado e nos macrófagos vizinhos de
16 forma parácrina.

17 Em relação ao grupo infectado com a cepa ME-49 após 24h, a partir das
18 análises qualitativas, observamos que o parasito não estava íntegro (Fig. 9A).
19 Por análise quantitativa, não houve alteração da população iNOS+ nos
20 macrófagos sem os parasitos internalizados, enquanto aumentou para cerca de
21 50% a população de macrófagos iNOS+ no grupo com restos do parasito (Fig.
22 9B).

23 Este experimento demonstra que a cepa RH induziu a redução da
24 produção de NO pela diminuição da expressão de iNOS e multiplica de forma
25 eficiente. A cepa ME-49 não induziu diminuição da produção de NO e nem da
26 expressão de iNOS e foi destruída e os restos do parasito podem estar
27 induzindo expressão de iNOS, conseqüentemente aumento da população
28 iNOS+.

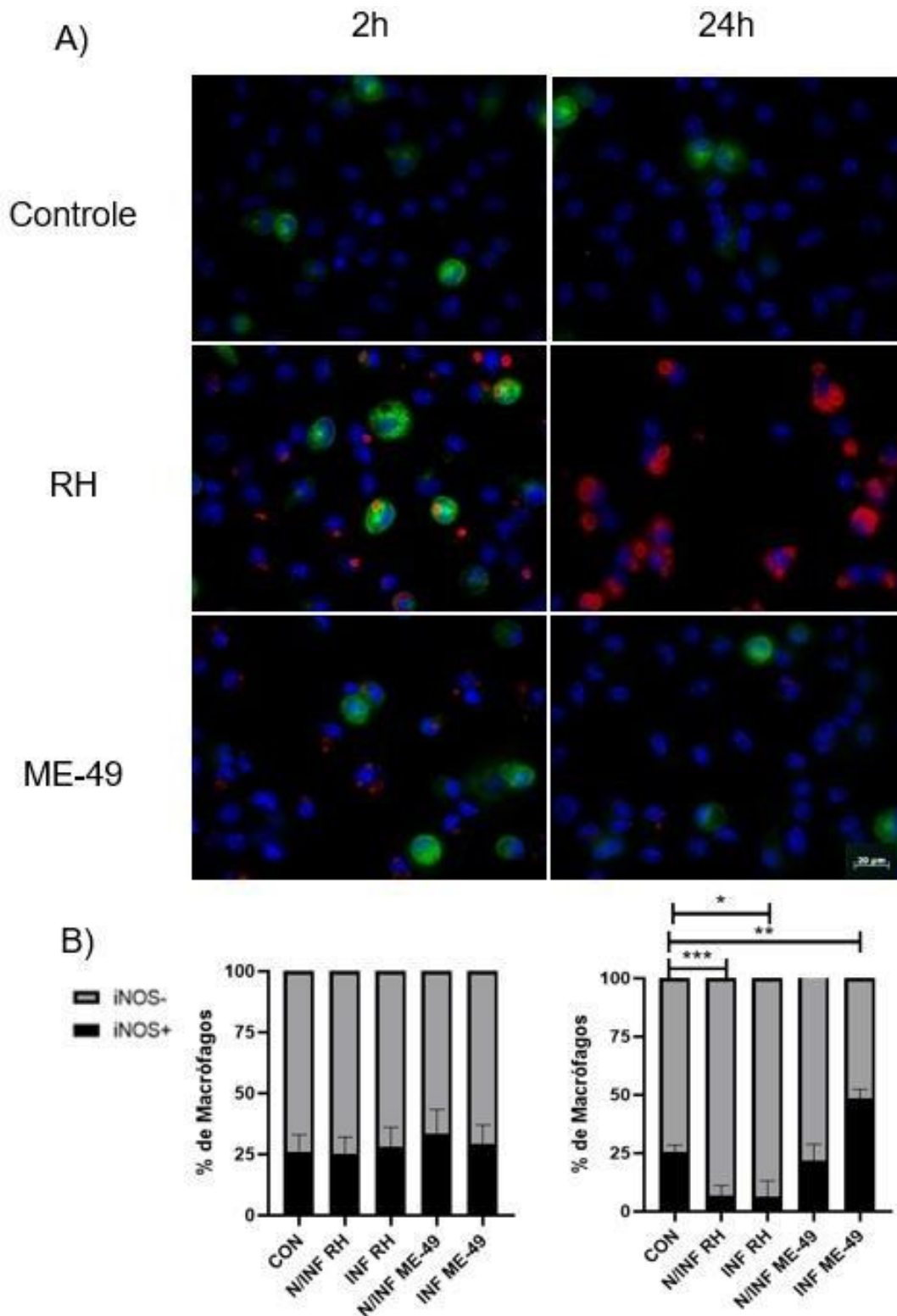


Figura 9. Detecção de iNOS por imunofluorescência em macrófagos peritoneais residentes ativados (MORes) infectados com *Toxoplasma gondii*. (A) Expressão de iNOS (verde) em MORes não infectados (controle) e infectados com *T. gondii* RH ou ME-49 (vermelho); MORes (DAPI - azul) em 2 e 24 h. (B) Percentagem de macrófagos iNOS+ e iNOS- em MORes não infectados (CON) desafiados com *T. gondii* em 2 e 24 h, sem parasito dentro da célula (N/INF) ou com parasito (INF); (n = 4 experimentos independentes. Resultados

apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$).

1 5.3. INTERAÇÃO PARASITO E MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES

2 A fim de verificar o desenvolvimento do parasito nas populações iNOS+
3 e iNOS-, fizemos análise quantitativa da porcentagem de macrófagos
4 infectados, a média de parasitos por macrófagos e o índice de infectividade,
5 que é o produto da porcentagem de macrófagos infectados com a média de
6 parasito por macrófago. Em relação aos MORes infectados com a cepa RH,
7 após 2 h de interação, o parasito invadiu cerca de 60% dos MORes iNOS+ e
8 MORes iNOS- e, após 24 h, aumentou para cerca de 90% em ambas as
9 populações (fig. 10A). A média de parasito por macrófago em 2 h de interação
10 é de aproximadamente 2 parasito por macrófagos (Fig. 10B). Após 24 h, o
11 parasito multiplica mais em MORes iNOS-, com aproximadamente 5 parasitos
12 por macrófagos, enquanto em MORes iNOS+, foi encontrado
13 aproximadamente 3 parasitos por macrófago. Em 2 h de interação, o índice de
14 infectividade de MORes iNOS+ e iNOS- foi similar. Porém, após 24 h, houve
15 aumento do índice de infectividade de MORes iNOS+ e iNOS-, sendo que o
16 índice de infectividade de MORes iNOS- aumentou para cerca de 500, o que é
17 1,7x maior do que o índice de infectividade da população iNOS+ (Fig. 10C).

18 Em relação aos MORes infectados com a cepa ME-49, em 2 h, o
19 parasito invadiu a mesma porcentagem de MORes iNOS+ e iNOS- (Fig. 10D).
20 Após 24 h, a quantidade de macrófagos infectados diminui para quase zero em
21 MORes iNOS+ e MORes iNOS-. A quantidade média de macrófagos que
22 invadiram as populações iNOS+ e iNOS- foi similar com cerca de 1,5 parasitos
23 por macrófago (fig. 10E). Após 24 h, a média de parasito por macrófago se
24 manteve. O índice de infectividade em 2 h de MORes iNOS+ e MORes iNOS-
25 foi igual (Fig. 10F) e semelhante ao índice de infectividade de MORes
26 infectados com a cepa RH (Fig. 10C). Porém, após 24 h de interação, o índice
27 de infectividade de MORes iNOS+ e iNOS- diminuiu para quase zero. Estes
28 resultados demonstraram que a cepa RH infecta na mesma quantidade e
29 proporção MORes iNOS+ e MORes iNOS- e se multiplica melhor em MORes
30 iNOS-, enquanto a cepa ME-49 também invade populações iNOS+ e iNOS- na

1 mesma quantidade e proporção. No entanto, é destruída após 24 h em
 2 populações iNOS+ e iNOS-.

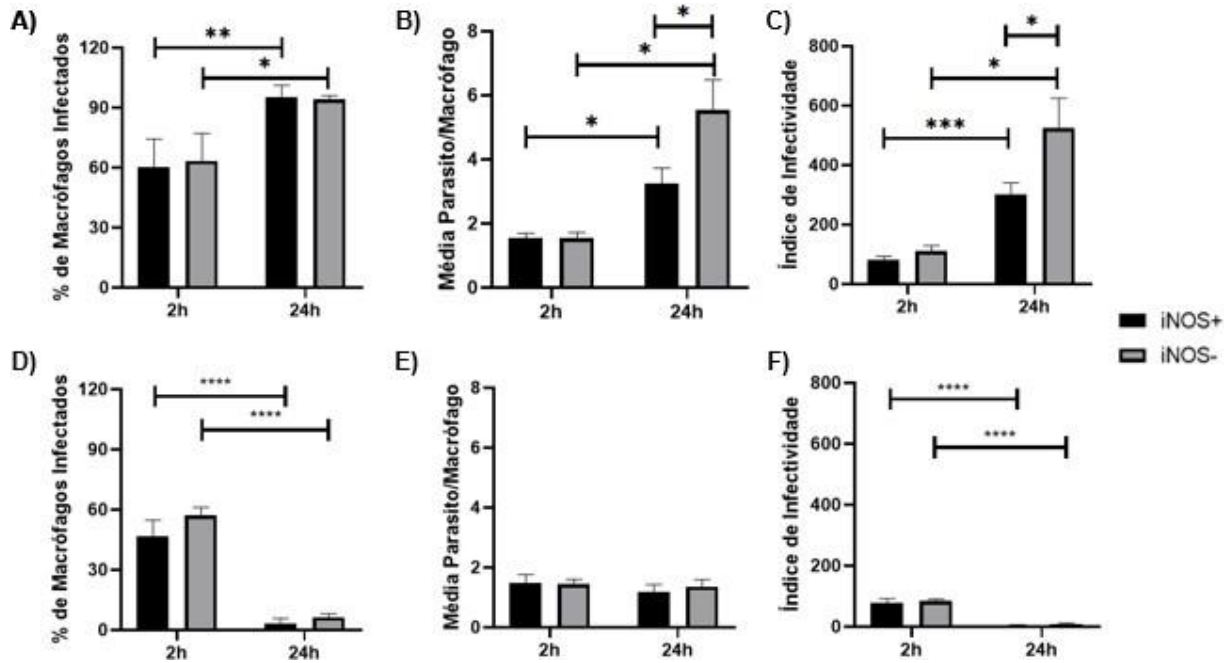


Figura 10. Interação entre macrófagos residentes peritoneais (MORes) que expressam iNOS (iNOS+) ou não (iNOS-) e *Toxoplasma gondii*. Porcentagem de MORes iNOS+ (coluna preta) e MORes iNOS- (coluna cinza) infectados com *T. gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (D) por 2 e 24 horas. Número de parasitos por MORes iNOS+ e MORes iNOS- infectados com cepa RH (B) ou ME-49 (E). Índice de infectividade (% de MORes iNOS+ e iNOS- infectados x média de parasitos por MORes infectado) de MORes iNOS+ e iNOS- infectados com cepa RH (C) ou ME-49 (F) (n = 5 experimentos independentes. Resultados apresentados como média ± SD. Análise estatística por teste t, onde *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

3 5.4. PRODUÇÃO DE NO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS 4 INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii* CEPAS RH E ME-49

5 Após 24 h de interação com a cepa RH, MOEst reduziram a produção de
 6 NO para quase 30% da produção de NO relativa ao grupo controle (Fig. 11A).
 7 No entanto, após 24 h de interação com a cepa ME-49, não houve redução
 8 significativa da produção de NO (Fig. 11B), assim como foi visto em MORes
 9 (Fig. 8B). Isso demonstra que, assim como ocorreu em MORes, *T. gondii* cepa
 10 RH foi capaz de inibir a produção de NO, enquanto a cepa ME-49, não.

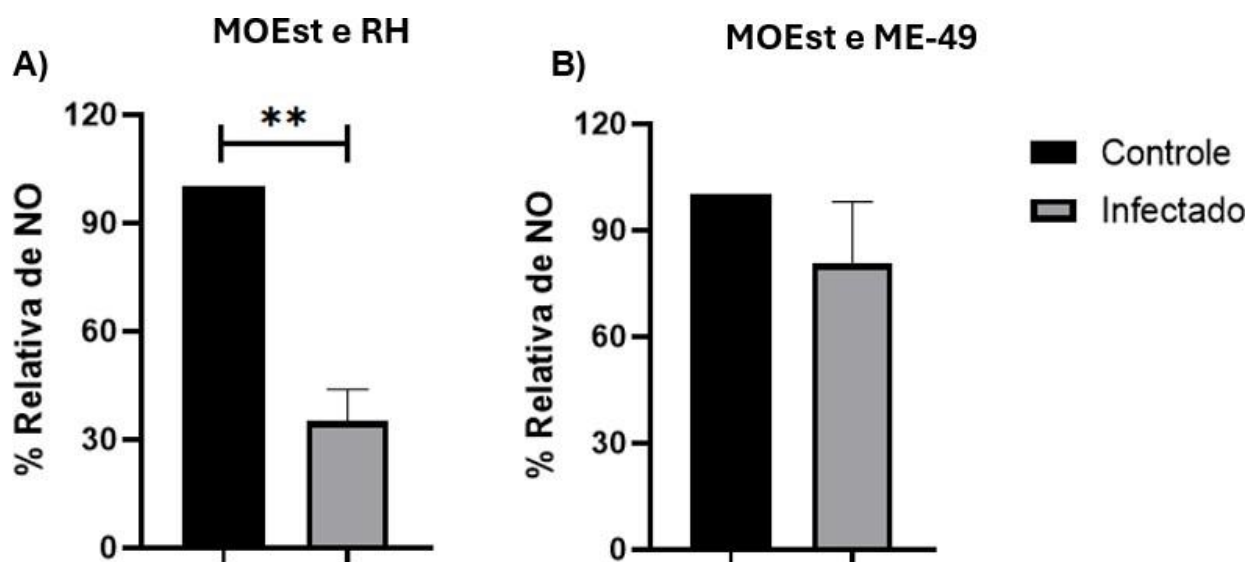


Figura 11. Porcentagem relativa da produção de NO de macrófagos peritoneais estimulados (MOEst). MOEst não infectados (controle – coluna preta) e infectados (coluna cinza) com *Toxoplasma gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (B) (n = 5 experimentos independentes. Resultados apresentados como média ± SD. Análise estatística por teste t, onde ** $P < 0,01$).

1 5.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iNOS POR MICROSCOPIA DE
 2 FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS
 3 INFECTADOS COM AS CEPAS RH E ME-49

4 Para verificar se a inibição de NO ocorria por causa da modulação de
 5 iNOS, assim como foi analisado em MORes, foi feita avaliação qualitativa e
 6 quantitativa por microscopia de fluorescência dos MOEst infectados com a
 7 cepa RH ou ME-49 após 2 e 24 h de interação. De forma qualitativa, observou-
 8 se que no grupo controle (não infectado) alguns macrófagos continham restos
 9 de *T. gondii* oriundo do estímulo inflamatório utilizado para recrutá-los e grande
 10 parte da população de MOEst expressaram iNOS (Fig. 12A). Após 24 h,
 11 visualmente a quantidade de células que tinham antígenos do parasito
 12 diminuiu. No grupo infectado com RH por 2 h, observou-se que o parasito
 13 invadiu células iNOS+ e iNOS-. Após 24 h de interação, as células infectadas
 14 continuaram expressando iNOS e o parasito replicou. Após 2 h de interação
 15 entre MOEst e a cepa ME-49, observou-se que o parasito invadiu MOEst

1 iNOS+ e iNOS-. Após 24 h de interação, cepa ME-49 foi destruída,
2 encontrando-se apenas restos do parasito em alguns macrófagos, assim como
3 foi visto em MORes.

4 Para confirmar esses dados qualitativos, foi realizada uma análise
5 quantitativa. O grupo controle foi separado em dois subgrupos: subgrupo que
6 tinha antígenos oriundo do peritônio e subgrupo que não tinha antígenos. Os
7 grupos infectados com a cepa RH ou ME-49 foram separados em dois
8 subgrupos: macrófagos que não tinham parasitos internalizados e macrófagos
9 com parasitos internalizados – para verificar se o parasito modulava a
10 expressão de iNOS de forma parácrina em macrófagos não infectados. Foi feita
11 a análise da relação de populações iNOS+ e iNOS- após 2 e 24 h de interação
12 (Fig. 12B). Os dados quantitativos demonstraram que grande parte das
13 populações de MOEst eram iNOS+ com mais de 60% expressando iNOS. Após
14 24 h, os grupos controles de MOEst com antígenos e sem antígenos reduziram
15 a quantidade de células iNOS+. Após 24 h de interação com a cepa RH ou
16 cepa ME-49, a quantidade de macrófagos iNOS+ em relação ao MOEst
17 controle sem antígeno não alterou, demonstrando que *T. gondii* cepa RH ou
18 cepa ME-49 não modulou a expressão de iNOS. Estes resultados demonstram
19 que a cepa RH inibiu a produção de NO sem modular a iNOS enquanto a cepa
20 ME-49 não inibiu a produção de NO e, após 24 h, foi destruída.

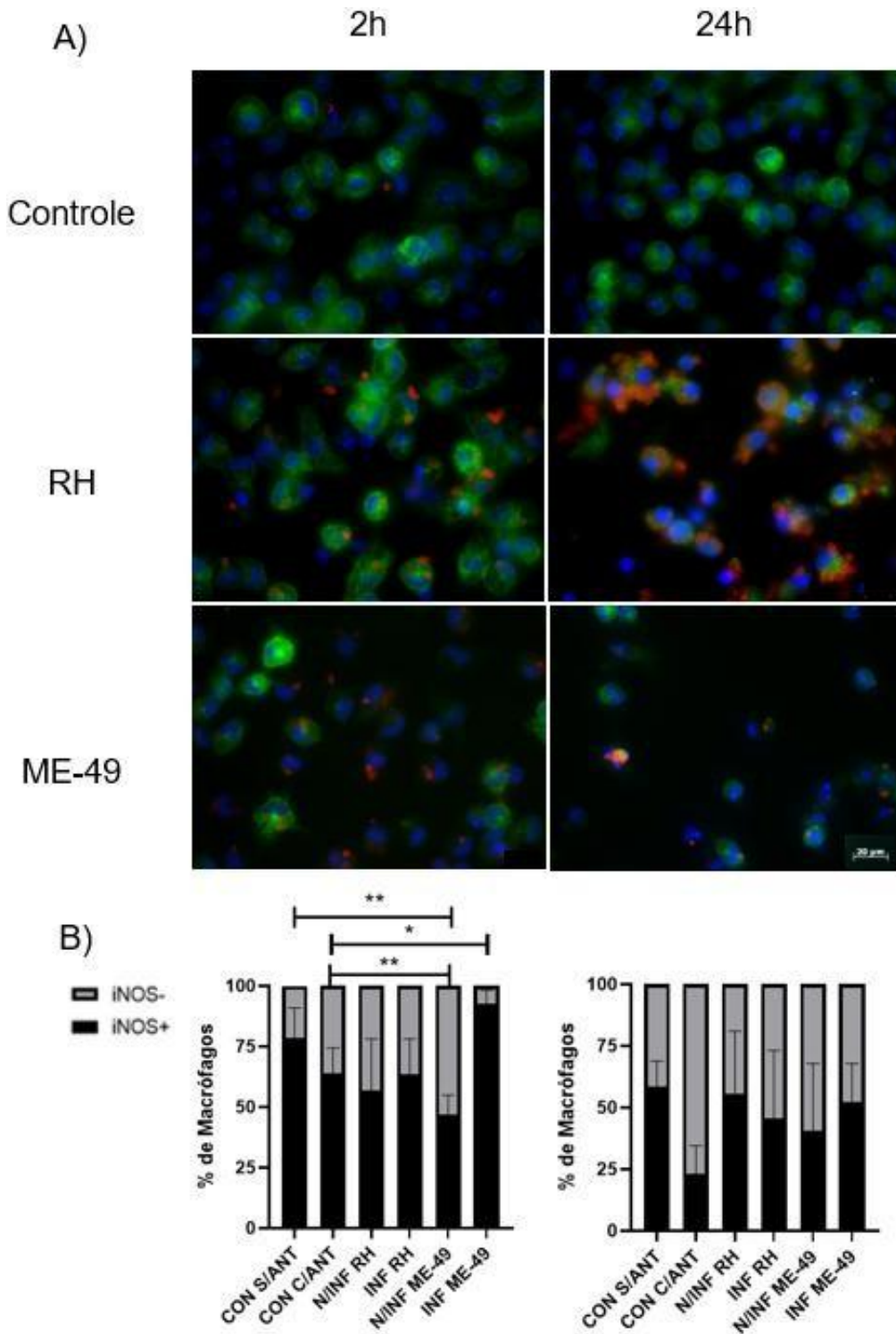


Figura 12. Detecção de iNOS por imunofluorescência em macrófagos peritoneais estimulados ativados (MOEst) infectados com *Toxoplasma gondii*. (A) Expressão de iNOS (verde) em MOEst não infectados (DAPI - azul) (controle) que vieram sem antígenos peritoneais (CON N/ANT) e com antígenos peritoneais (CON W/ANT) e MOEst infectados com a cepa ME-49 ou a cepa RH de *T. gondii* (vermelho) em 2 e 24 horas. (B) Análise da razão iNOS+ e iNOS- em MOEst não infectados (controle) e desafiados com a cepa ME-49 ou RH de *T. gondii* em 2 e 24 horas, mostrando células sem parasito (N/infectado) ou com parasito

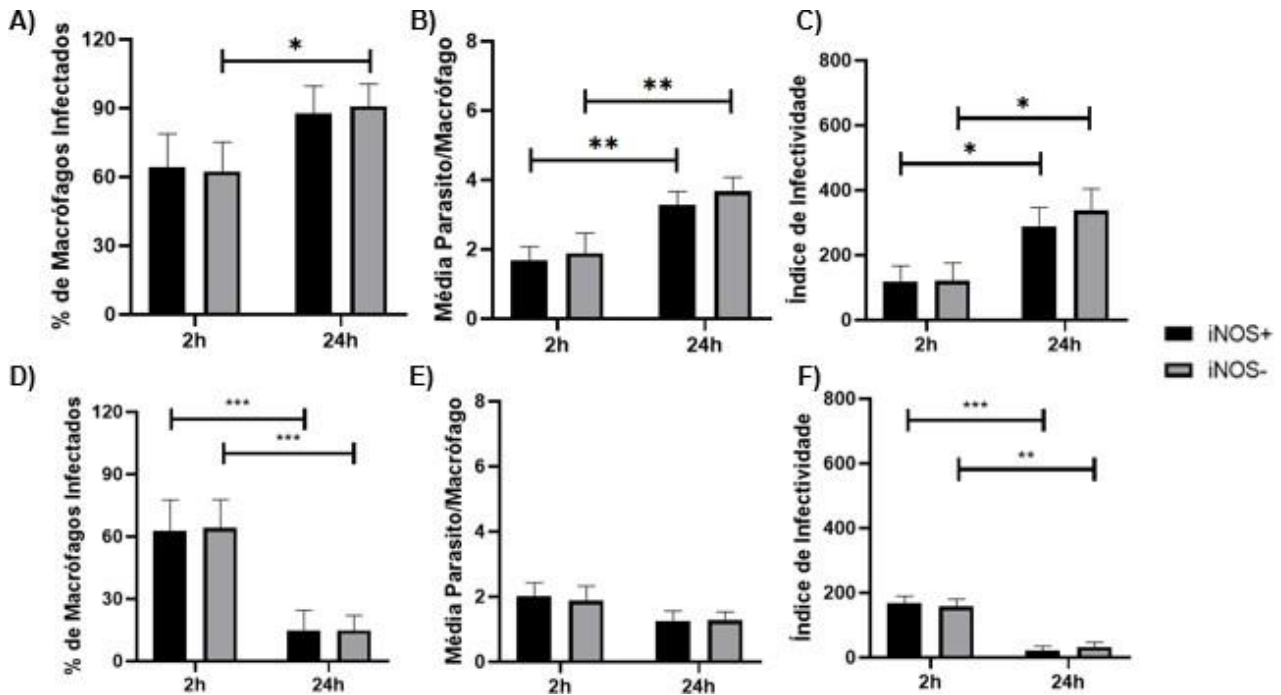
(infectado) (n = 4 experimentos independentes. Resultados apresentados como média \pm SD. Análise estatística por teste t, onde $*P < 0,05$, $**P < 0,01$).

1 5.6. INTERAÇÃO PARASITO E MACRÓFAGOS PERITONEAIS 2 ESTIMULADOS

3 Com intuito de avaliar a sobrevivência, multiplicação ou destruição do
4 parasito em populações iNOS+ ou iNOS-, foi realizada a análise de forma
5 quantitativa do desenvolvimento do parasito. Foi avaliado a porcentagem dos
6 MOEst infectados, média do parasito por macrófago e o índice de infectividade
7 de populações iNOS+ e iNOS- após 2 e 24 h de interação com a cepa RH ou
8 ME-49. Em relação aos MOEst infectados com a cepa RH, foi visto que, em 2 h
9 de interação, cerca de 60% de macrófagos iNOS+ e iNOS- estavam infectados
10 e, após 24 h, aumentou para cerca de 90% em ambas as populações (Fig.
11 13A). Em 2 h de interação, a quantidade média de parasito por macrófago em
12 populações iNOS+ e iNOS- era a mesma: cerca de 2 parasitos por macrófagos
13 (fig. 6B). Após 24 h, houve aumento para entre 3 e 4 parasitos por macrófagos
14 tanto em MOEst iNOS+ quanto MOEst iNOS-. O índice de infectividade das
15 populações iNOS+ e iNOS-, após 24 h de interação, aumentou para quase 400
16 em MOEst iNOS+ e iNOS-, atingindo aproximadamente a mesma quantidade
17 (Fig. 13C). Quando o índice de infectividade de MOEst iNOS- (Fig. 13C) é
18 comparado com o índice de infectividade de MORes iNOS- (Fig. 10C) observa-
19 se que o último é muito menor, demonstrando que MOEst iNOS- controla
20 melhor a replicação de *T. gondii* cepa RH do que MORes iNOS-.

21 Em relação aos MOEst infectados com a cepa ME-49, observou-se que
22 em 2 h de interação cerca de 60% de MOEst iNOS+ e iNOS- estavam
23 infectados (Fig. 13D). Porém, após 24 h de interação, menos de 20% dos
24 MOEst iNOS+ e iNOS- estavam infectados (Fig. 13D). A média de parasito que
25 estavam nos macrófagos em 2 h de interação era cerca de 2 parasitos por
26 macrófagos em população iNOS+ e iNOS- (Fig. 13E). Após 24 h, a média de
27 parasito por macrófago caiu para quase 1 parasito por macrófago (Fig. 13E), de
28 acordo com as imagens de microscopia de fluorescência, o parasito não estava
29 íntegro. O índice de infectividade em 2 h de interação foi o mesmo para iNOS+
30 e iNOS-, quase 200 (Fig. 13F). Após 24 h de interação, o índice de
31 infectividade decaiu bruscamente para menos de 50 em MOEst iNOS+ e iNOS-
32 . O índice de infectividade dos MOEst iNOS+ e iNOS-, após 24 h de interação,

1 foi um pouco maior (Fig. 13F) do que o índice de infectividade dos MORes (Fig.
 2 10F). Porém, foi observado que a quantidade de parasito que interagiu com
 3 MOEst em 2 h foi maior do que a quantidade de parasito que interagiu com
 4 MORes. Enquanto MORes apresentava em média 1,5 parasitos por



5 macrófagos (Fig. 10E), os MOEst apresentaram 2 parasitos por macrófago
 6 (Fig. 13E), ou seja, ¼ de carga parasitária maior.

Figura 13. Interação entre macrófagos peritoneais estimulados (MOEst) que expressam iNOS (iNOS+) ou não (iNOS-) e *Toxoplasma gondii*. Porcentagem de MOEst iNOS+ (coluna preta) e MOEst iNOS- (coluna cinza) infectados com *T. gondii* cepa RH (A) ou ME-49 (D) por 2 e 24 horas. Número de parasitos por MOEst iNOS+ e MOEst iNOS- infectados com cepa RH (B) ou ME-49 (E). Índice de infectividade (% de MOEst iNOS+ e iNOS- infectados x média de parasitos por MOEst infectado) de MOEst iNOS+ e iNOS- infectados com cepa RH (C) ou ME-49 (F) (n = 5 experimentos independentes. Resultados apresentados como média ± SD. Análise estatística por teste t, onde *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

7 5.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iNOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

8 Para confirmar os dados quantitativos realizado por microscopia de
 9 fluorescência, foi realizada a análise da expressão de iNOS de MORes por
 10 citometria de fluxo. Para realizar esta análise, o primeiro passo foi estabelecer
 11 metodologia para soltar os MORes do substrato recuperando o máximo de
 12 células viáveis sem que houvesse degradação de proteínas de superfície que
 13 futuramente seriam utilizadas na identificação das subpopulações de MORes e
 14 MOEst.

1 Dessa forma, as células foram soltas transferindo-as da temperatura de
2 cultivo 37°C para banho de gelo à 4°C. Foi testado a soltura dos macrófagos
3 peritoneais residentes utilizando PBS ou PBS com EDTA em diferentes
4 concentrações à 4°C por 20 min. Com exceção do grupo PBS+EDTA 0,5%,
5 todos os grupos soltaram mais do que 50% da população de macrófagos (Fig.
6 14). Foi escolhido apenas PBS à 4°C para realizar a soltura.

7

8

9

10

11

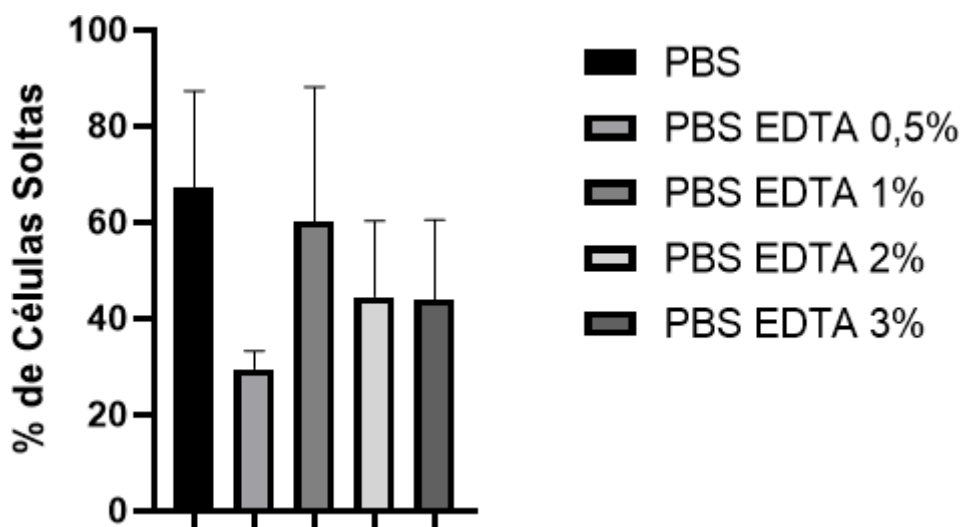


Figura 14. Teste de recuperação de macrófagos peritoneais residentes. Células soltas por choque térmico sob PBS ou PBS + EDTA com diferentes concentrações à 4°C durante 20 min. (n = 3 experimentos independentes).

12

13

14

15

16

17

18

A fim de otimizar o processo de soltura e recuperar o máximo de células, o tempo de incubação a 4°C foi aumentado para 40 min e foi utilizado PBS ou PBS mais o êmbolo da seringa. Após a soltura, os macrófagos foram identificados por tamanho e granulosidade (Fig. 15A) e foi visto que aproximadamente 80% foram recuperados com cerca de 70% de viabilidade em ambos os métodos - PBS ou PBS mais o êmbolo da seringa (Fig. 15B).

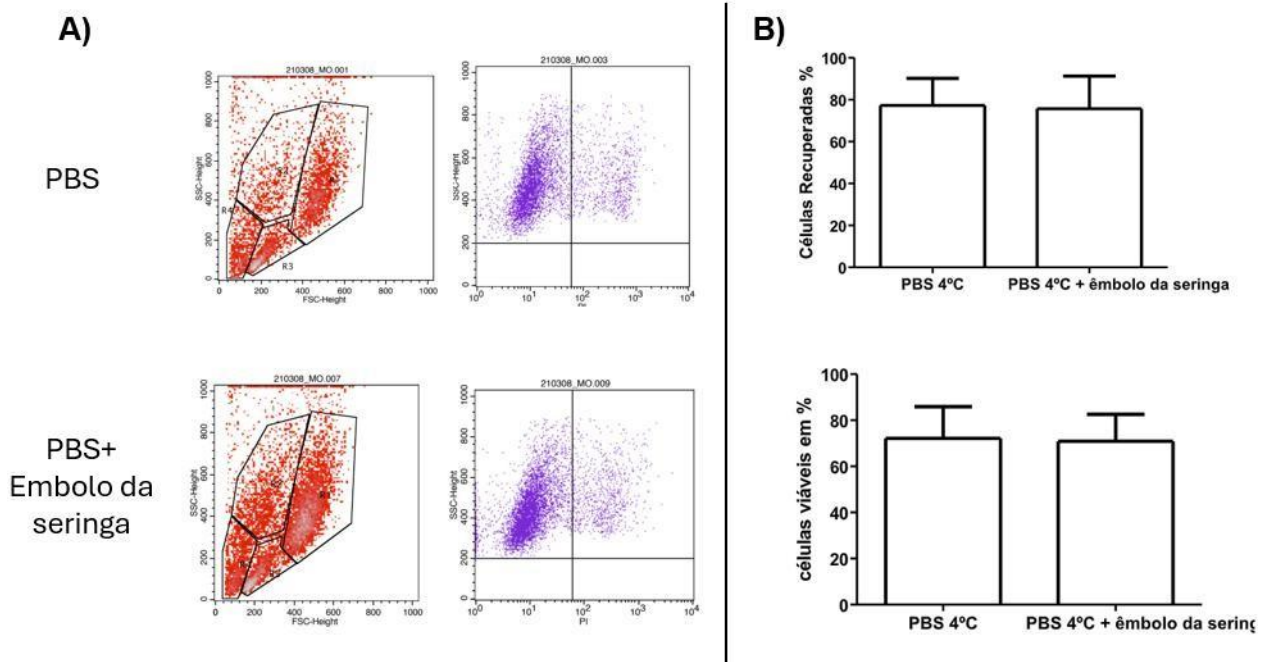


Figura 15. Soltura e viabilidades dos macrófagos. Macrófagos peritoneais residentes soltos em PBS ou PBS + êmbolo da seringa à temperatura de 4°C e identificados por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), selecionando macrófagos como a população R1 e viabilidade desta população por iodeto de propídio (PI) (A). Análise quantitativa das células soltas e viabilidade (B) (n = 3 experimentos independentes. Resultados apresentados como a média \pm SD).

1

2 Então, foi feita a análise da expressão de iNOS por citometria de fluxo
 3 em MORes infectados com a cepa RH por 2 e 24 h (Fig. 16). Ainda
 4 preliminarmente, foram identificados os macrófagos por tamanho e
 5 granulosidade (Fig. 16A) e avaliado de forma quantitativa a relação da
 6 porcentagem de macrófagos iNOS+ e iNOS- após 2 h de interação (Fig. 16B).
 7 O grupo não interagido (controle) e o grupo interagido - o qual foi subdividido
 8 em células sem marcação para o parasito e célula com marcação que
 9 expressaram iNOS ou não. Após 2 h de interação, observou-se que não
 10 ocorreu alteração expressivo da população iNOS+ nos diferentes grupos.
 11 Porém, após 24 h, observou-se que a população INOS+ diminuiu
 12 drasticamente, tanto em células com parasito quanto células sem parasito (Fig.
 13 16C e D), confirmando os dados da microscopia de fluorescência o qual o
 14 parasito da cepa RH modula negativamente a expressão de iNOS nos MORes
 15 infectados e nos não infectados (Fig. 2B), sendo neste último de forma
 16 parácrina.

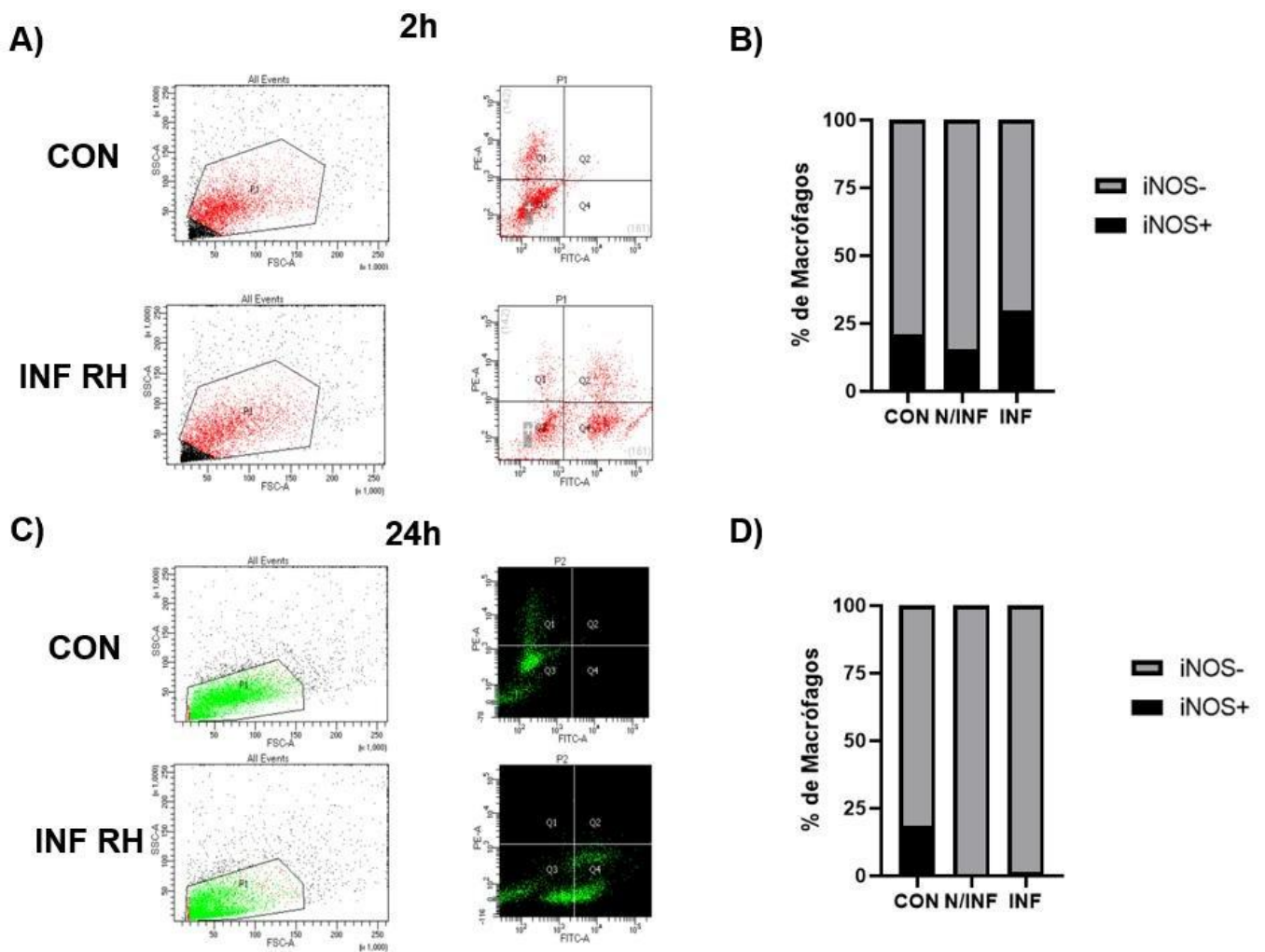


Figura 16. Expressão de iNOS por citometria de fluxo de macrófagos peritoneais residentes infectados por *Toxoplasma gondii*. Macrófagos peritoneais residentes (P1) não interagido (CON) e interagido com *T. gondii* cepa RH (INF RH), analisando expressão de iNOS (PE) e parasito (FITC) com 2 h (A) ou 24 h interação (C). Análise quantitativa da relação entre células iNOS+ (coluna preta) e iNOS- (coluna cinza) de Mores não interagido (CON) e interagido - sem parasitos internalizados (N/INF) ou internalizados (INF) - por 2 h (B) ou 24 h (D). (n = 1 experimento independente).

1 6. DISCUSSÃO

2 O parasito *Toxoplasma gondii* tem grande importância clínica e científica,
3 sendo capaz de invadir células nucleadas de animais vertebrados
4 homeotérmicos, entre eles seres humanos, causando a toxoplasmose. O *T.*
5 *gondii* é capaz de evadir do sistema imunológico do hospedeiro e, dependendo
6 da cepa e do sistema imunológico, causar a morte. Desse modo, se faz
7 necessário estudos sobre a biologia das diferentes cepas do parasito e seus
8 mecanismos de escape ao sistema microbicida de células do sistema imune
9 como macrófagos, a fim de compreender a biologia do parasito e encontrar
10 possíveis alvos de terapia. Neste trabalho, foi investigado se *T. gondii* cepa RH
11 e ME-49 são capazes de inibir a produção de NO pela modulação da
12 expressão de iNOS e se desenvolver em diferentes tipos de macrófagos
13 peritoneais de camundongos.

14 MORes foram ativados e infectados com a cepa RH ou ME-49. Após 24
15 h de interação com a cepa RH, MORes diminuíram a produção de NO
16 corroborando com os resultados determinados previamente pelo grupo (Seabra
17 *et al.*, 2002; 2004; Padrão *et al.*, 2014; Damasceno-Sá *et al.*, 2021),
18 confirmando que o parasito desta cepa inibe a produção de NO neste tipo de
19 macrófago. No entanto, após interação de MORes com a cepa ME-49, não
20 ocorreu a diminuição da produção de NO, diferentemente do relatado por
21 Damasceno-Sá *et al.* (2021). Porém, nossos resultados possivelmente diferem
22 devido ao número de parasito utilizado para infectar os macrófagos. Enquanto
23 neste trabalho foi utilizado a proporção 5:1 (parasito:macrófago), Damasceno-
24 Sá *et al.* (2021) utilizou 10:1. A maior relação parasito:macrófago poderia
25 explicar a redução da produção de NO em 24 h descrita por eles.

26 A expressão de iNOS foi verificada por microscopia de fluorescência
27 para verificar possível modulação após infecção. Nesse caso, foi observado
28 que MORes não interagidos (grupo controle) apresentaram poucas células
29 iNOS+, mostrando que há heterogeneidade nos MORes como descrito por
30 Ghosn *et al.* (2010). Em 2 h de interação com a cepa RH ou ME49, os dados
31 qualitativos demonstram que o parasito invade células iNOS+ e iNOS- da

1 mesma forma. Após 24 h de interação com a cepa RH, ocorreu a diminuição de
2 MORes iNOS+ e alta replicação do parasito principalmente nas células iNOS-,
3 mostrando que NO tem papel crucial no controle de *T. gondii*. Em relação à
4 cepa ME-49, após 24 h de interação, revelou uma quantidade de MORes
5 iNOS+ parecida com o grupo controle, e o parasito não conseguiu multiplicar,
6 pelo contrário, encontrando apenas restos do parasito. Isso evidencia que esta
7 cepa, menos virulenta, é destruída pelo sistema autônomo dos macrófagos
8 como as GBPs, IRGs e NO como demonstrado por Zhao *et al.* (2024). Essa
9 destruição do parasito da cepa ME-49 corrobora com os achados do grupo de
10 Damasceno-Sá *et al.* (2021). Esses achados confirmam que estes macrófagos
11 conseguem controlar a proliferação e destruir o parasito.

12 De acordo com os dados quantitativos, MORes controle apresentou
13 cerca de 25% de população iNOS+, evidenciando a heterogeneidade nos
14 MORes como descritos por Ghosn *et al.* (2010). Possivelmente há
15 subpopulações mais sensíveis aos ativadores do que outras. Tendo em vista
16 que 10% dos MORes são SPM e 90% são LPM (Ghosn *et al.*, 2010), observou-
17 se que apenas 25% da população de MORes expressou iNOS, é provável que
18 a população mais sensível aos ativadores seja majoritariamente SPM. No
19 grupo interagido, foi subdividido em MORes com parasitos internalizados
20 (MORes infectados) e MORes sem os parasitos (MORes não infectados), a fim
21 de verificar se ocorria modulação negativa da expressão de iNOS de forma
22 parácrina nos macrófagos não infectados. Após 2 h de interação com a cepa
23 RH ou ME-49, a quantidade de MORes iNOS+ se manteve. Porém, em 24 h de
24 interação com a cepa RH, MORes que estavam com parasitos internalizados
25 ou MORes sem parasito diminuíram a quantidade de MORes iNOS+. Isso
26 demonstra que a cepa RH inibe a produção de NO pela modulação negativa da
27 expressão de iNOS nos macrófagos infectados e nos macrófagos vizinhos,
28 sendo neste último de forma parácrina, o que corrobora com os achados do
29 grupo (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Padrão *et al.*, 2014, Damasceno-Sá *et al.*,
30 2021). A cepa ME-49, no entanto, após 24 h de interação, não modulou
31 negativamente a expressão de iNOS. Os macrófagos que tinham os restos do
32 parasito aumentaram a expressão de iNOS, pois como o parasito foi destruído,
33 os restos do parasito possivelmente foram reconhecidos pelos receptores de

1 padrão molecular associado a patógenos, induzindo maior perfil microbicida
2 dos macrófagos.

3 Para confirmar os dados anteriores de desenvolvimento ou destruição
4 dos parasitos e verificar em qual população, iNOS+ ou iNOS-, o parasito estava
5 sendo destruído, fizemos análise quantitativa da replicação do parasito. Em 2 h
6 de interação com cepa RH ou ME-49, 60% dos MORes iNOS+ e iNOS-
7 apresentaram aproximadamente 2 parasitos por macrófagos, mostrando que o
8 parasito, de ambas as cepas, invadiu na mesma proporção as populações
9 iNOS+ e iNOS-. Após 24 h de interação com a cepa RH, a porcentagem de
10 MORes infectados aumentou da mesma forma em MORes iNOS+ e iNOS-.
11 Porém, o número médio de parasito por macrófago e o índice de infectividade
12 aumentaram principalmente em células iNOS- com quase duas vezes mais o
13 número de parasitos por macrófagos do que a população iNOS+. Esses dados
14 demonstram que, embora a mesma quantidade de células iNOS+ e iNOS-
15 estejam infectadas, a quantidade de parasito dentro dessas células foi
16 diferente, sendo a expressão da iNOS e a produção de NO a distinção mais
17 óbvia. Isso evidencia o papel crucial do NO durante o controle da proliferação
18 do parasito como descrito por Adams *et al.*, (1990). Em relação à cepa ME-49,
19 após 24 h de interação, a porcentagem de MORes infectados, o número médio
20 de parasito por macrófago, e o índice de infecção diminuíram drasticamente em
21 ambas as populações iNOS+ e iNOS-. Esses dados demonstram que os
22 MORes que expressam iNOS e os que não expressam controlam a proliferação
23 e destroem a cepa ME-49 da mesma forma, possivelmente por outros
24 mecanismos microbicidas do sistema autônomo da célula como GBPs e IRGs
25 como demonstrado por Zhao *et al.* (2024) e abordado por Ihara & Nishikawa
26 (2025).

27 MOEst foram ativados, infectados com a cepa RH ou ME-49, e realizado
28 os mesmos ensaios realizados com MORes. MOEst infectados com a cepa RH
29 durante 24 h apresentaram redução da produção de NO, mas ao serem
30 infectados com a cepa ME-49 não ocorreu redução. Esses dados são
31 semelhantes aos mostrados em MORes infectados. Isso demonstra que a cepa
32 RH de *T. gondii* inibe a produção de NO como demonstrado anteriormente
33 (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Padrão *et al.*, 2014, Damasceno-Sá *et al.*, 2021),

1 mas, de forma inédita, em MOEst. Por outro lado, a cepa ME-49 não inibiu a
2 produção de NO, assim como foi visto em MORes. Isso possivelmente está
3 relacionado com a carga parasitária necessária para reduzir NO em 24 h ou
4 provavelmente os MOEst são mais microbicidas com capacidade de destruir
5 mais eficientemente a cepa ME-49, impossibilitando o parasito de inibir o NO.

6 A primeira diferença entre os MOEst e os MORes verificada foi a
7 quantidade de células iNOS+. A maioria dos MOEst eram iNOS+, como
8 esperado, devido ao estímulo inflamatório realizado para alterar as
9 subpopulações de macrófagos peritoneais, os quais causam influxo de
10 monócitos inflamatórios, aumento da subpopulação SPM e a migração dos
11 LPM para o omento de acordo com Accarias *et al.* (2016) e Dunay *et al.* (2008).
12 Então, a maioria das células obtidas são SPM e monócitos inflamatórios
13 (Dunay *et al.*, 2008). Esse resultado corrobora com o resultado observado em
14 MORes. Nos MORes, 25% eram iNOS+ e, como abordado, cerca de 10% dos
15 MORes são SPM o que provavelmente demonstra que a probabilidade destas
16 células serem mais sensíveis aos ativadores é maior. Como teve aumento da
17 subpopulação SPM e de monócitos inflamatórios atrelado à diminuição da
18 subpopulação LPM em MOEst, que provavelmente é menos sensível aos
19 ativadores IFN- γ e LPS, o que pode explicar a maior quantidade de células
20 iNOS+. Além disso, foi observado que alguns MOEst vieram com antígenos
21 oriundo da peritonite causada pelo baixo inóculo de *T. gondii* da cepa ME-49.
22 Isso favorece um perfil mais microbicida dos MOEst, pois estão “prontos” para
23 reconhecer o parasito previamente destruído, processo definido como “*priming*
24 *immunity*” como abordado por Ochando *et al.* (2023). Nas primeiras horas de
25 infecção com a cepa RH ou ME-49, MOEst iNOS+ e iNOS- foram infectados de
26 forma similar. Após 24 h de interação, MOEst infectados com a cepa RH de *T.*
27 *gondii* mantiveram a expressão de iNOS e reduziram a replicação do parasito
28 quando comparado ao MORes. Esse dado demonstra que a inibição da
29 produção de NO não ocorre pela modulação negativa de iNOS, ou seja, a
30 inibição de NO ocorre por outra via em MOEst, como observado em
31 macrófagos RAW 264.7 por Cabral *et al.* (2018). Em relação à interação entre
32 MOEst e a cepa ME-49 de *T. godii*, observamos que o parasito, assim como
33 nos MORes, foi destruído em 24 h, restando apenas antígenos tanto na

1 população iNOS+ quanto na população iNOS-, demonstrando que outros
2 sistemas microbicidas controlam e destroem o parasito.

3 A análise quantitativa da relação de MOEst iNOS+ e iNOS- foi realizada
4 após a infecção. Para isso, MOEst controle foram separados em dois
5 subgrupos: um subgrupo com o antígeno e outro subgrupo sem os antígenos.
6 Em 2 h MOEst com e sem antígenos apresentaram mais de 50% de células
7 iNOS+. Porém, em 24 h, a quantidade de células iNOS+ dos MOEst com
8 antígeno diminuiu. Possivelmente o excesso de NO pode ter causado morte
9 das células como descrito por Cinelli *et al.* (2020) ou o excesso de ativadores
10 tenha desencadeado tolerância de ativação dos macrófagos como abordado
11 por Ochando *et al.* (2023).

12 Os grupos interagidos com as cepas RH ou ME-49 também foram
13 subdivididos em subgrupos: MOEst com parasitos internalizados (MOEst
14 infectados) e sem parasitos internalizados (MOEst não infectados); a fim de
15 verificar se ocorre a diminuição de MOEst iNOS+ em macrófagos sem parasito.
16 Após 2 h de interação com as cepas RH ou ME-49, MOEst não reduziram as
17 células iNOS+. Em MOEst infectados com ME-49, houve maior quantidade da
18 população iNOS+ quando comparado aos outros grupos e subgrupos. Esse
19 resultado pode ser explicado por MOEst estarem “prontos” para reconhecer e
20 responder melhor à infecção como abordado por Ochando *et al.* (2023).
21 Observou-se que após 24 h de interação com as cepas RH e ME-49, não
22 houve alteração da quantidade de células iNOS+ em relação ao subgrupo
23 MOEst controle sem antígenos. Isso demonstra que a cepa RH inibe a
24 produção de NO sem modular negativamente a expressão de iNOS em MOEst
25 como descrito por Cabral *et al.* (2018) em macrófagos RAW 264.7. Além disso,
26 estes dados demonstram que MOEst não alteraram a expressão de iNOS após
27 infecção com ME-49 como demonstrado pela microscopia de fluorescência.
28 Além disso, houve a destruição do parasito. Isso mostra que a cepa ME-49 não
29 inibe a produção de NO e nem altera a expressão de iNOS possivelmente por
30 estar sendo destruído pelos macrófagos.

31 Com intuito de verificar se o parasito da cepa RH ou ME-49 se
32 desenvolveram em populações iNOS+ e iNOS- de MOEst, foi realizada a
33 análise quantitativa de parasitos e células infectadas. Observou-se que, assim

1 como MORes, os parasitos de ambas as cepas infectaram em 2 h 60% dos
2 MOEst iNOS+ e iNOS-, o que mostra que o parasito não invade de forma
3 preferencial uma população específica. Após 24 h de interação com a cepa RH,
4 a porcentagem de células infectadas, o número médio de parasitos por
5 macrófagos e o índice de infecção aumentaram da mesma forma em
6 populações iNOS+ e iNOS-. Quando o índice de infectividade de MOEst iNOS-
7 foi comparado com o índice de infectividade de MORes iNOS-, nota-se que o
8 índice de infectividade de MOEst iNOS- é menor. Esse dado demonstra que as
9 células iNOS- dos MOEst possuem algo diferente dos MORes iNOS-. Uma
10 dessas possíveis diferenças é a subpopulação o que pode explicar a distinção
11 no controle da proliferação do parasito de forma mais eficiente realizado pelos
12 MOEst iNOS- do que os MORes iNOS-. Possivelmente deve haver um
13 mecanismo microbicida que age melhor em subpopulações de MOEst do que
14 em subpopulações de MORes. Em relação aos MOEst infectados com a cepa
15 ME-49, observamos que a porcentagem de macrófagos infectados, número
16 médio de parasitos por macrófagos e o índice de infectividade diminuíram
17 drasticamente em populações iNOS+ e iNOS-. Mais uma vez demonstra-se
18 que ambas as populações de MOEst, iNOS+ e iNOS-, são capazes de
19 controlar e destruir *T. gondii* da cepa ME-49, como visto em MORes. Porém,
20 quando comparamos o índice de infectividade dos MOEst com os MORes
21 infectados com a cepa ME-49, nota-se que o índice de infectividade é maior no
22 MOEst. Isso se deve ao fato de que o número de parasito que invadiu MOEst
23 ser maior do que em MORes. Porém, é necessário verificar se o parasito
24 entrou ativamente ou se foi fagocitado.

25 Com intuito de confirmar os dados quantitativos referentes à modulação
26 da expressão de iNOS em MORes por microscopia de fluorescência, foi
27 realizada a análise por citometria de fluxo. Porém, antes, a metodologia de
28 soltura de MORes plaqueados foi estabelecida utilizando PBS ou PBS+EDTA.
29 Observou-se que o PBS sozinho soltou de 60 e 70% de células, similar ao
30 obtido com PBS+EDTA, como demonstrado por Chen *et al.* (2015). Então, com
31 intuito de otimizar o método, o tempo de soltura foi aumentado para 40 min,
32 mas agora utilizando apenas PBS ou PBS associado a remoção mecânica com
33 êmbolo da seringa, e avaliou-se a viabilidade dessas células com iodeto de

1 propídio. Nesse caso, ocorreu um aumento para quase 80% de células soltas
2 com o uso do PBS ou PBS associado ao êmbolo da seringa com viabilidade
3 entre 70 e 80%. Isso demonstra que apenas o PBS no tempo de 40 min é
4 suficiente para recuperar grande quantidade de células com alta viabilidade,
5 sendo este método o escolhido para soltar os macrófagos após infecção com *T.*
6 *gondii*.

7 A partir do emprego da citometria de fluxo de MORes soltos expressão
8 de iNOS dos MORes infectados com a cepa RH foi analisada. Macrófagos
9 foram identificados por tamanho e granulosidade e depois a fluorescência de
10 iNOS e parasito analisada. Os resultados indicaram que quase 25% dos
11 macrófagos não interagidos (controle) era iNOS+, corroborando com os dados
12 da imunofluorescência e embasando a hipótese de que a grande maioria da
13 população sensíveis seja a subpopulação SPM, abordado anteriormente. No
14 grupo interagido com o parasito, subdividiu-se em dois subgrupos: subgrupo de
15 MORes sem o parasito internalizado e o subgrupo com o parasito internalizado.
16 Os dados indicaram que em 2 h de interação, a quantidade de células iNOS+
17 foi parecida com MORes. Porém, após 24 h ocorreu a diminuição da população
18 de MORes iNOS+ nas células com e sem parasito internalizado. Esses dados
19 confirmam os resultados observados anteriormente pela análise na microscopia
20 de fluorescência de Seabra *et al.* (2004), Padrão *et al.* (2014) e Cabral *et al.*
21 (2018), os quais demonstram que a cepa RH do parasito inibe a produção de
22 NO modulando negativamente a expressão da enzima iNOS em MORes
23 infectados e não infectados (sinalização parácrina).

1 7. CONCLUSÕES

2 MORes e MOEst apresentam diferenças de subpopulações de
3 macrófagos. Poucos MORes são sensíveis aos ativadores nas concentrações
4 utilizadas no trabalho, enquanto MOEst são mais sensíveis.

5 A cepa RH de *T. gondii* inibiu a produção de NO em MORes e MOEst,
6 induzindo a diminuição da expressão de iNOS em MORes, mas não em
7 MOEst. Portanto, a via de inibição de NO é diferente conforme o tipo de
8 macrófago infectado por RH. A cepa RH proliferou mais eficientemente em
9 MORes iNOS-, demonstrando o papel crucial de NO no controle do parasito.
10 Em MOEst, RH replicou em iNOS+ e iNOS- na mesma intensidade. MOEst
11 iNOS-, quando comparados aos MORes iNOS-, apresentou menor índice de
12 infectividade, o que sugere que subpopulações de macrófagos deste tipo são
13 diferentes e produzem fatores diferentes que controlam a proliferação do
14 parasito da mesma forma que MOEst iNOS+.

15 A cepa ME-49 de *T. gondii* não inibiu a produção de NO de MORes e
16 MOEst e foi destruída em ambos os macrófagos iNOS+ e iNOS-. Após
17 destruição do parasito, teve maior expressão de iNOS em MORes. Além disso,
18 o parasito foi destruído em populações iNOS+ e iNOS- de MORes e MOEst,
19 demonstrando que há outros sistemas microbicidas como GBPs e IRGs
20 atuando no parasito.

21 É necessário mais estudo a fim de confirmar as subpopulações
22 presentes nos MORes e MOEst e verificar quais expressam iNOS. É
23 necessário verificar quais subpopulações conseguem controlar a replicação do
24 parasito de diferentes cepas. Além disso, é de extrema importância averiguar
25 se ocorre a inibição de NO da mesma maneira em diferentes subpopulações de
26 MORes e MOEst. Finalmente, é crucial avaliar quais os diferentes mecanismos
27 moleculares que o parasito utiliza para inibir NO por vias distintas das
28 diferentes subpopulações de MORes e MOEst. Dessa forma, será possível
29 compreender como o parasito evade o sistema microbicida de diferentes tipos
30 de macrófagos.

1 **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

2 Pretende-se investigar a interação das cepas RH e ME-49 de *T. gondii*
3 com as subpopulações de MORes e MOEst, avaliando marcadores de
4 superfície. As subpopulações LPM, SPM e monócitos inflamatórios serão dessa
5 forma separados possibilitando averiguar se a inibição de NO e expressão de
6 iNOS difere nessas células. Além disso, análises por *Western blotting* e
7 citometria de fluxo serão utilizados para verificar a degradação de iNOS nos
8 MORes e MOEst, confirmando os dados de microscopia de fluorescência.

1 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 Accarias S, Genthon C, Rengel D, Boullier S, Foucras G, Tabouret G. Single-
3 cell analysis reveals new subset markers of murine peritoneal macrophages
4 and highlights macrophage dynamics upon *Staphylococcus aureus*
5 peritonitis. *Innate Immun.* 2016 Jul;22(5):382-92.
- 6 Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of
7 murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of
8 inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.* 1990 Apr
9 1;144(7):2725-9.
- 10 Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W.
11 The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit*
12 *Vectors.* 2020 Nov 23;13(1):588.
- 13 Bekkering S, Domínguez-Andrés J, Joosten LAB, Riksen NP, Netea MG.
14 Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease.
15 *Annu Rev Immunol.* 2021 Apr 26;39:667-693.
- 16 Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol*
17 *Rev.* 2000 Sep;64(3):607-23.
- 18 Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma*
19 *gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:463-85.
- 20 Cabral GRA, Wang ZT, Sibley LD, DaMatta RA. Inhibition of Nitric Oxide
21 Production in Activated Macrophages Caused by *Toxoplasma*
22 *gondii* Infection Occurs by Distinct Mechanisms in Different Mouse
23 Macrophage Cell Lines. *Front Microbiol.* 2018 Aug 20;9:1936.
- 24 Canè S, Geiger R, Bronte V. The roles of arginases and arginine in immunity.
25 *Nat Rev Immunol.* 2025 Apr;25(4):266-284.
- 26 Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma*
27 *gondii*. *Acta Trop.* 2002 Feb;81(2):111-22.
- 28 Cassado Ados A, de Albuquerque JA, Sardinha LR, Buzzo Cde L, Faustino L,
29 Nascimento R, Ghosn EE, Lima MR, Alvarez JM, Bortoluci KR. Cellular
30 renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in
31 response to infectious stimuli. *PLoS One.* 2011;6(7):e22141.
- 32 Cassado Ados A, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse
33 peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front*
34 *Immunol.* 2015 May 19;6:225.

1 Chen S, So EC, Strome SE, Zhang X. Impact of Detachment Methods on M2
2 Macrophage Phenotype and Function. J Immunol Methods. 2015
3 Nov;426:56-61.

4 Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase:
5 Regulation, structure, and inhibition. Med Res Rev. 2020 Jan;40(1):158-189.

6 Damasceno-Sá JC, de Souza FS, Dos Santos TAT, de Oliveira FC, da Silva
7 MFS, Dias RRF, de Souza W, Arnholdt ACV, Seabra SH, DaMatta RA.
8 Inhibition of nitric oxide production of activated mice peritoneal macrophages
9 is independent of the *Toxoplasma gondii* strain. Mem Inst Oswaldo Cruz.
10 2021 Mar 10;116:e200417.

11 Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Van der Giessen J, Dubey JP.
12 Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. Food Waterborne
13 Parasitol. 2019 Apr 18;15:e00054.

14 Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,
15 bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.
16 Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):267-99.

17 Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD. Gr1(+)
18 inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen
19 *Toxoplasma gondii*. Immunity. 2008 Aug 15;29(2):306-17.

20 Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM,
21 Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically,
22 functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets.
23 Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb 9;107(6):2568-73.

24 Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions.
25 BMC Biol. 2017 Jun 29;15(1):53.

26 Guillermo LV, DaMatta RA. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii*
27 infection of chicken macrophage cell lines. Poult Sci. 2004 May;83(5):776-82.

28 Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages:
29 correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995
30 Dec;172(6):1561-6.

31 Ihara F, Nishikawa Y. *Toxoplasma gondii* manipulates host cell signaling
32 pathways via its secreted effector molecules. Parasitol Int. 2021
33 Aug;83:102368.

1 Lazarov T, Juarez-Carreño S, Cox N, Geissmann F. Physiology and diseases of
2 tissue-resident macrophages. *Nature*. 2023 Jun;618(7966):698-707.

3 Lindmark H, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bruder CE. Gene expression
4 profiling shows that macrophages derived from mouse embryonic stem cells
5 is an improved in vitro model for studies of vascular disease. *Exp Cell Res*.
6 2004 Nov 1;300(2):335-44.

7 Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation:
8 time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014 Mar 3;6:13.

9 Mildner A, Marinkovic G, Jung S. Murine Monocytes: Origins, Subsets, Fates,
10 and Functions. *Microbiol Spectr*. 2016 Oct;4(5).

11 Minhas R, Bansal Y, Bansal G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A
12 comprehensive update. *Med Res Rev*. 2020 May;40(3):823-855.

13 Mitchell AJ, Roediger B, Weninger W. Monocyte homeostasis and the plasticity
14 of inflammatory monocytes. *Cell Immunol*. 2014 Sep-Oct;291(1-2):22-31.

15 Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate
16 host defense. *Cell Host Microbe*. 2011 May 19;9(5):355-61.

17 Ochando J, Mulder WJM, Madsen JC, Netea MG, Duivenvoorden R. Trained
18 immunity - basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev*
19 *Nephrol*. 2023 Jan;19(1):23-37.

20 Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of
21 localization and functional polarization of macrophages. *Cell*. 2014 May
22 8;157(4):832-44.

23 Padrão Jda C, Cabral GR, da Silva Mde F, Seabra SH, DaMatta RA.
24 *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes
25 inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway.
26 *Parasitol Int*. 2014 Oct;63(5):659-63.

27 Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of
28 *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and
29 congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 2009 Oct;39(12):1385-94.

30 Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources,
31 targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*.
32 2015 Jan;30(1):11-26.

1 Randow F, MacMicking JD, James LC. Cellular self-defense: how cell-
2 autonomous immunity protects against pathogens. *Science*.
3 2013;340(6133):701-6.

4 Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of
5 *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host.
6 *Trends Parasitol*. 2005 Oct;21(10):476-81.

7 Saeij JP, Frickel EM. Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a
8 role for GBPs, autophagy and host cell death. *Curr Opin Microbiol*. 2017
9 Dec;40:72-80. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.021. Epub 2017 Nov 12. PMID:
10 29141239; PMCID: PMC7004510.

11 Santos TA, Portes Jde A, Damasceno-Sá JC, Caldas LA, Souza Wd, Damatta
12 RA, Seabra SH. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is
13 fundamental to balance the immune response granting survival of the
14 parasite and of the host. *PLoS One*. (2011).

15 Seabra SH, de Souza W, Damatta RA. *Toxoplasma gondii* exposes
16 phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating
17 macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov
18 12;324(2):744-52.

19 Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric
20 oxide production of activated murine macrophages. *Exp Parasitol*. 2002
21 Jan;100(1):62-70.

22 Sengupta PP, Jacob SS, Suresh KP, Rajamani S, Maharana SM. Exploring
23 global trends in human toxoplasmosis seroprevalence by meta-analysis. *Exp*
24 *Parasitol*. 2025 Aug;275:108971.

25 Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili
26 SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage
27 plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*.
28 2018 Sep;233(9):6425-6440.

29 Smith NC, Goulart C, Hayward JA, Kupz A, Miller CM, van Dooren GG. Control
30 of human toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 2021 Feb;51(2-3):95-121.

31 Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S.
32 Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*.
33 2005;23:901-44.

- 1 Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to
2 humans [published correction appears in Int J Parasitol. (2001).
- 3 Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW,
4 Ricklefs SM, Porcella SF, Li L, Ellies LG, Wynn TA. Cationic amino acid
5 transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. PLoS
6 Pathog. 2008 Mar 14;4(3):e1000023.
- 7 Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The
8 Metabolic Signature of Macrophage Responses. Front Immunol. 2019 Jul
9 3;10:1462.
- 10 Vischer wa, Suter E. Intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* in adult
11 mammalian macrophages cultivated in vitro. Proc Soc Exp Biol Med. 1954
12 Jul;86(3):413-9.
- 13 Wanderley JLM, DaMatta RA, Barcinski MA. Apoptotic mimicry as a strategy for
14 the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived
15 phosphatidylserine as key molecule. Cell Commun Signal. 2020 Jan
16 15;18(1):10.
- 17 Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The Ontogeny of Monocyte
18 Subsets. Front Immunol. 2019 Jul 17;10:1642.
- 19 Wong K, Valdez PA, Tan C, Yeh S, Hongo JA, Ouyang W. Phosphatidylserine
20 receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of
21 resident peritoneal macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May
22 11;107(19):8712-7.
- 23 Zhao XY, Lempke SL, Urbán Arroyo JC, Brown IG, Yin B, Magaj MM, Holness
24 NK, Smiley J, Redemann S, Ewald SE. iNOS is necessary for GBP-mediated
25 *T. gondii* clearance in murine macrophages via vacuole nitration and
26 intravacuolar network collapse. Nat Commun. 2024 Mar 27;15(1):2698.