

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CULTURA  
PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DURANTE A  
INFECÇÃO COM TAQUIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

ALESSANDRO AFORNALI

Curitiba

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

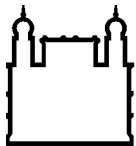
A257 Afornali, Alessandro

Análise diferencial da expressão gênica de cultura primária de células musculares esqueléticas durante a infecção com taquissoítos de *toxoplasma gondii* / Alessandro Afornali. – Rio de Janeiro, 2006. 176 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2006.  
Bibliografia: f. 153-176.

1. Expressão gênica. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Músculo esquelético. I. Título.

CDD: 579.4



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*ALESSANDRO AFORNALI*

Análise Diferencial da Expressão Gênica de Cultura Primária de Células Musculares  
Esqueléticas Durante a Infecção com Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

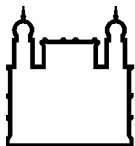
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador (es):** Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger  
Prof. Dr. Christian Macagnan Probst

**CURITIBA**

2006

ii



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

***AUTOR: ALESSANDRO AFORNALI***

### ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DURANTE A INFECÇÃO COM TAQUIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger  
Prof. Dr. Christian Macagnan Probst**

**Aprovada em: 14/06/2006**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Helene Santos Barbosa – IOC - Presidente**

**Prof. Dr. Marcelo Távora Mira - PUCPR**

**Prof. Dr. Alejandro Dominguez Correa - IBMP**

Curitiba, 01 de novembro de 2006

Aos meus pais e irmãos que tanto amo.

“Na vida é preferível arriscar conquistas grandiosas mesmo se expondo a derrota, do que formar fila com pobres de espírito, que não conhecem nem vitória e nem derrota.”

(Autor desconhecido)

# AGRADECIMENTOS

Venho inicialmente agradecer aos meus pais e irmãos que possessivamente apoiaram e ajudaram de alguma maneira a vencer esta etapa, que marcante, irá sempre repercutir como uma vitória em minha vida.

Quero agradecer especialmente ao meu amigo Christian Macagnan Probst pela atenciosa ajuda na correção e discussão dos meus resultados, acreditando sempre na minha capacidade científica de abordar um assunto tão complexo como o apresentado neste trabalho e alimentando idéias que me moveram a desenvolvê-las.

Também quero agradecer ao meu orientador Dr. Marco Aurélio Krieger, que sempre me encorajando e estimulando, de maneira otimista, me forneceu a oportunidade de poder desenvolver este trabalho de mestrado no IBMP, ao qual tenho orgulho de realizá-lo.

Quero agradecer à Dra. Helene Santos Barbosa e todos os membros do Departamento de Ultra-Estrutura e Biologia Celular do IOC que, diretamente ou indiretamente, disponibilizaram e cederam materiais que foram indispensáveis para o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço amorosamente a Susana Cristina Becker pela compreensão, incentivo, atenção e conforto que prestou em todo esse tempo.

Finalmente, com satisfação inestimável da ajuda de todos do IBMP, um grandioso e sincero OBRIGADO.

# Índice remissivo

Índice remissivo.....	vi
Índice de figuras.....	ix
Índice de gráficos.....	xi
Índice de tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1 Introdução.....	1
1.1 Conhecimentos gerais.....	2
1.1.1 Enquadramento taxionômico do parasita.....	2
1.1.2 Morfologia e habitat.....	3
1.1.3 Ciclo biológico.....	5
1.1.4 Epidemiologia.....	9
1.1.5 Transmissão.....	10
1.1.6 Patogenia.....	11
1.1.7 Diagnóstico laboratorial.....	13
1.2 O parasita.....	15
1.2.1 Cepas de <i>T. gondii</i> .....	15
1.2.2 Ultra-estrutura.....	16
1.3 Espectro de hospedeiros do <i>T. gondii</i> .....	20
1.3.1 Tipos tissulares infectados pelo parasita.....	20
1.3.2 Modelos murinos de infecção.....	20
1.4 Interação parasita-hospedeiro.....	22
1.4.1 Superfície do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	22
1.4.2 Ligantes encontrados na célula hospedeira.....	23
1.5 Ciclo lítico.....	24
1.5.1 Invasão do parasita.....	24
1.5.2 Eventos secretórios durante a invasão.....	27
1.5.3 Formação e modificação do vacúolo parasitóforo pelo parasita.....	29



1.5.4	Replicação do parasita .....	30
1.5.5	Egresso .....	31
1.5.6	Sinalizadores da invasão e o egresso .....	31
1.6	Alterações na célula hospedeira .....	33
1.6.1	Modificações fisiológicas na célula hospedeira.....	34
1.6.2	Retirada dos nutrientes do hospedeiro .....	34
1.7	Encistamento e permanência na célula mamífera.....	37
1.8	Genômica funcional.....	38
1.8.1	Definição de microarranjo .....	41
1.8.2	Genômica funcional da interação parasita-hospedeiro.....	49
2	Objetivo do trabalho .....	50
2.1	Objetivos específicos.....	50
3	Material e métodos.....	51
3.1	Obtenção de culturas primárias de células musculares esqueléticas .....	51
3.1.1	Material: .....	51
3.1.2	Procedimento .....	52
3.1.3	Característica da cultura.....	54
3.1.4	Soluções e Meios de cultura .....	54
3.2	Obtenção dos parasitas .....	55
3.3	Preparação do material para microarranjo (GeneChip®).....	56
3.3.1	Lista de material utilizado.....	56
3.3.2	Procedimento .....	57
3.4	Amostras estudadas .....	62
3.5	Desenho experimental.....	63
3.6	Etapas da análise .....	63
3.6.1	Métodos de Análise dos Dados .....	64
3.6.2	Reconhecimento de genes diferencialmente expressos.....	66
3.7	Análise por agrupamento .....	67
3.8	Análise por ontologia gênica.....	68
3.9	Análise por redes gênicas .....	68

4	Resultados .....	70
4.1	Descrição .....	70
4.2	Genes diferencialmente expressos (DEG) .....	70
4.2.1	Genes selecionados por Li e Wong .....	71
4.2.2	Genes selecionados por gcRMA .....	71
4.2.3	Determinação de DEG comuns aos dois métodos .....	72
4.3	Organização dos DEG por agrupamento hierárquico .....	93
4.4	Resultado da análise por GO .....	94
4.4.1	Contagens dos principais GOs .....	95
4.4.2	Análise de termos GO enriquecidos considerando todos DEG .....	98
4.4.3	Comparação dos genes aumentados e diminuídos em 24 horas de infecção .....	100
4.5	Análise por redes gênicas .....	103
4.5.1	Resultados dos genes selecionados em 30 minutos de infecção .....	104
4.5.2	Resultados dos genes selecionados em 4 horas de infecção .....	107
4.5.3	Resultados dos genes selecionados em 24 horas de infecção .....	117
4.5.4	Considerações finais sobre a análise de redes gênicas .....	133
5	Discussão .....	134
5.1	Comparação com outros estudos de genômica funcional .....	134
5.2	Sistemas e processos biológicos modulados .....	143
5.2.1	Cálcio .....	143
5.2.2	Vesículas lisossomais .....	145
5.2.3	Apoptose .....	146
5.2.4	Ciclo Celular .....	148
5.2.5	Outras funções .....	150
6	Conclusões .....	151
7	Perspectivas .....	152
8	Referências bibliográficas .....	153

# Índice de figuras

Figura 1.1. Taquizoítos de <i>T. gondii</i> . .....	4
Figura 1.2. Bradizoítos encistados em tecido muscular. ....	4
Figura 1.3. Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> envolvendo a fase sexuada e assexuada.....	5
Figura 1.4. Representação do ciclo sexuada no gato não-imune. ....	8
Figura 1.5. Desenho esquemático de taquizoíto e bradizoíto de <i>T. gondii</i> . ....	16
Figura 1.6. Representação esquemática do complexo apical do <i>T. gondii</i> . ....	18
Figura 1.7. Citoesqueleto de tubulina ( <i>T. gondii</i> ). ....	18
Figura 1.8. Desenho esquemático do arranjo citoesquelético do <i>T. gondii</i> . ....	19
Figura 1.9. Representação do ciclo lítico do <i>Toxoplasma gondii</i> . ....	25
Figura 1.10. Modelos de motilidade no <i>T. gondii</i> . ....	28
Figura 1.11. Etapas necessárias para a invasão celular do <i>T. gondii</i> . ....	29
Figura 1.12. Ilustração do fenômeno de divisão do <i>Toxoplasma gondii</i> por endodiogenia. ....	32
Figura 1.13. Dendrograma ilustrativo, contendo genes modulados em resposta ao estresse oxidativo.....	49
Figura 3.1. Representação esquemática do arranjo de sondas GeneChip®.....	60
Figura 4.1. Descrição dos elementos caracterizando os termos GO.....	98
Figura 4.2. Termos GO sobre-representados relativos a transporte .....	99
Figura 4.3. Termos GO sobre-representados relativos a sinalização. ....	99
Figura 4.4. Termo GO sobre-representados relativos a complexo protéico.....	100
Figura 4.5. Termo GO sobre-representados relativos a atividade de transporte .....	100
Figura 4.6. Rede gênica 1, modulada em 30 minutos (crescimento e morte celular).....	105
Figura 4.7. Rede gênica 2, modulada em 30 minutos (crescimento e morte celular).....	105
Figura 4.8. Rede gênica 3, modulada em 30 minutos (ciclo celular e crescimento).....	106
Figura 4.9. Representação esquemática dos genes conectando as redes de 4 horas.....	108
Figura 4.10. Rede gênica 1, modulada em 4 horas (inflamação, crescimento) .....	109
Figura 4.11. Rede gênica 2, modulada em 4 horas (inflamação crescimento) .....	109
Figura 4.12. Rede gênica 3, modulada em 4 horas (morte celular e crescimento).....	110

Figura 4.13. Rede gênica 4, modulada em 4 horas (morte celular, interação e sinalização célula-célula).....	111
Figura 4.14. Rede gênica 5, modulada em 4 horas (morte celular e movimento celular). ....	112
Figura 4.15. Rede gênica 6, modulada em 4 horas (câncer e doença do sistema reprodutivo)....	113
Figura 4.16. Rede gênica 7, modulada em 4 horas (replicação do DNA, recombinação e reparo). .....	114
Figura 4.17. Rede gênica 8, modulada em 4 horas (morfologia celular e sistema imune).....	115
Figura 4.18. Rede gênica 9, modulada em 4 horas (desenvol. celular, sistema muscular e esquelético).....	115
Figura 4.19. Rede gênica 10, modulada em 4 horas (câncer, morfologia celular). ....	117
Figura 4.20. Rede gênica 11, modulada em 4 horas (ciclo celular, movimento celular).....	118
Figura 4.21. Representação esquemática dos genes conectando as redes de 24 horas. ....	119
Figura 4.22. Rede gênica 1, modulada em 24 horas (desenvol. celular, sistema muscular e esquelético).....	120
Figura 4.23. Rede gênica 2, modulada em 24 horas (metabolismo de lipídeos, doença cardiovascular). ....	121
Figura 4.24. Rede gênica 3, modulada em 24 horas (replicação do DNA, recombinação e reparo). .....	122
Figura 4.25. Rede gênica 4, modulada em 24 horas (replicação do DNA, recombinação e reparo). .....	123
Figura 4.26. Rede gênica 5, modulada em 24 horas (movimento celular, crescimento e proliferação). ....	124
Figura 4.27. Rede gênica 6, em 24 horas (desenv. sistema nervoso e metabol. de aminoácidos).	126
Figura 4.28. Rede gênica 7, modulada em 24 horas (doença inflamatória e desenvol. celular)...	128
Figura 4.29. Rede gênica 8, modulada em 24 horas (morfologia celular e proliferação e crescimento). ....	129
Figura 4.30. Rede gênica 9, modulada em 24 horas (expressão gênica , injúria e anomalias).....	130
Figura 4.31. Rede gênica 10, modulada em 24 horas (expressão gênica e desenvol. celular).....	131
Figura 4.32. Rede gênica 11, modulada em 24 horas (síntese protéica, câncer e morte celular). .	132

## Índice de gráficos

Gráfico 4.1. Expressão diferencial do gene <i>s100g</i> .....	73
Gráfico 4.2. Expressão diferencial do gene <i>trappc5</i> .....	74
Gráfico 4.3. Expressão diferencial do gene <i>snail</i> .....	75
Gráfico 4.4. Expressão diferencial do gene <i>yipf5</i> .....	76
Gráfico 4.5. Expressão diferencial do gene <i>atp6v1d</i> .....	77
Gráfico 4.6. Expressão diferencial do gene <i>atp6v1b2</i> .....	78
Gráfico 4.7. Expressão diferencial do gene <i>snapap</i> .....	78
Gráfico 4.8. Expressão diferencial do gene <i>amotl2</i> .....	79
Gráfico 4.9. Expressão diferencial do gene <i>tmem43</i> .....	80
Gráfico 4.10. Expressão diferencial do gene <i>zfp36</i> .....	80
Gráfico 4.11. Expressão diferencial do gene <i>fosb</i> .....	81
Gráfico 4.12. Expressão diferencial do gene <i>fos</i> .....	83
Gráfico 4.13. Expressão diferencial do gene <i>btg2</i> .....	84
Gráfico 4.14. Expressão diferencial do gene <i>irf1</i> .....	85
Gráfico 4.15. Expressão diferencial do gene <i>dnajb1</i> .....	86
Gráfico 4.16. Expressão diferencial do gene <i>gadd45b</i> .....	87
Gráfico 4.17. Expressão diferencial do gene <i>actb</i> .....	88
Gráfico 4.18. Expressão diferencial do gene <i>upp1</i> .....	89
Gráfico 4.19. Expressão diferencial do gene <i>atf3</i> .....	90
Gráfico 4.20. Expressão diferencial do gene <i>egr1</i> .....	91
Gráfico 4.21. Expressão diferencial do gene <i>egr2</i> .....	92
Gráfico 4.22. Expressão diferencial do gene <i>ier2</i> .....	93
Gráfico 4.23. Clusterização hierárquica dos DEG.....	94

## Índice de tabelas

Tabela 3.1. Esquema para síntese da primeira fita de cDNA.....	58
Tabela 3.2. Esquema para síntese da segunda fita de cDNA.....	58
Tabela 3.3. Mistura de reação para hibridação.....	61
Tabela 4.1. Termos GO mais comuns de função molecular dentre os 678 DEG .....	96
Tabela 4.2. Termos GO mais comuns de processo biológico dentre os 678 DEG.....	97
Tabela 4.3. Termos GO mais comuns de componente celular dentre os 678 DEG .....	98
Tabela 4.4. Termos GO de processo biológico diferencialmente representados entre 24 horas aumentado e diminuído.....	101
Tabela 4.5. Termos GO de componente celular diferencialmente representados entre 24 horas aumentado e diminuído.....	102
Tabela 4.6. Termos GO de componente celular diferencialmente representados entre 24 horas aumentado e diminuído.....	103
Tabela 4.7. Redes gênicas mais afetadas no tempo de 30 minutos de infecção.....	104
Tabela 4.8. Redes gênicas mais afetadas no tempo de 4 horas de infecção.....	107
Tabela 4.9. Redes gênicas mais afetadas no tempo de 24 horas de infecção.....	119
Tabela 5.1. Número de DEG selecionados em nosso trabalho com FC 1,75 e FDR 5%.....	135
Tabela 5.2. Descrição dos 21 genes aumentados em 30 minutos selecionados em nosso trabalho .....	135
Tabela 5.3. Representação parcial da listagem de DEG, evidenciando as proteínas RAB selecionadas .....	142
Tabela 5.4. Processos biológicos modulados em 24 horas de infecção em nosso estudo.....	143

## Resumo

A metodologia de microarranjo é uma poderosa ferramenta para a análise de expressão diferencial ocorrida durante a infecção por um patógeno. O presente trabalho se propõe a estudar o processo biológico a nível transcricional da resposta da célula hospedeira à infecção causada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* através do uso da técnica de microarranjo de alta densidade (GeneChip®). Foram avaliados os tempos de 30 minutos, 4 horas e 24 horas de infecção, utilizando células de cultura primária de tecido muscular esquelético murino infectadas com taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Neste trabalho foram selecionados 22 genes candidatos para o processo infectivo através da correlação entre dois métodos de análise, Li-Wong e gcRMA. Uma análise por ontologia (GO) evidenciou diversos processos biológicos durante a infecção estudada. Uma análise comparativa com o trabalho de BLADER e colaboradores revelou uma boa correlação dos dados. Em nossos resultados obtivemos 42 genes selecionados em 30 minutos, 95 genes selecionados em 4 horas e 631 genes selecionados em 24 horas que passaram pelo critério estatístico e de razão de mudança maior que 1,75 vez. Destes 631 genes, 435 tinham processo celular anotado, sendo que 120 genes (27,6%) estão envolvidos no metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, 78 genes (17,9%) estão envolvidos na regulação transcricional, 77 genes (17,7%) estão envolvidos na sinalização celular, 44 genes (10,1%) estão envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos, 29 genes (6,7%) estão envolvidos no ciclo celular, 28 genes (6,4%) estão envolvidos na adesão celular e citoesqueleto, 24 genes (5,5%) estão envolvidos na síntese protéica e degradação, 22 genes (5,1%) estão envolvidos na apoptose e 8 genes (1,8%) estão envolvidos em processos inflamatórios. Posteriormente, o programa *Ingenity Pathways Analysis* 3.1 foi utilizado para a construção de redes de interação e regulação de proteínas. Através desta análise foi possível selecionar as principais redes moduladas durante a infecção. Nosso trabalho identificou muitas mudanças na expressão de diversos genes envolvidos na fusão e no transporte mediado por vesícula, incluindo as proteínas Rabs e proteínas acessórias do complexo, genes envolvidos na resposta inflamatória, genes envolvidos em apoptose e genes envolvidos no ciclo celular, dentre outros, que servirão para a realização de análises biológicas posteriores.

## Abstract

The microarray technique is a powerful tool to analyze the changes in gene expression occurring during an infectious process caused by a pathogen. This work aims to study the biological process of interaction between a host cell and an intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, at a transcriptional level, using a high density microarray (Genechip®). Samples were collected from 30 minutes, 4 hours and 24 hours of infection, using mice skeletal muscular cells from a primary culture infected with tachyzoites of *Toxoplasma gondii*, strain RH. We have selected 22 candidate genes modulated in the infectious process, by using two different analysis methods (Li-Wong and gcRMA). An analysis based on gene ontology (GO) has provided several biological processes that are affected during the infection. A comparative analysis with the work of BLADER *et al.* showed a good correlation between both datasets. In our results, we have obtained 42 differentially expressed genes in 30 minutes, 95 in 4 hours and 631 in 24 hours, after a selection based in statistical (5% FDR) and fold change ( $\geq 1.75$ ) criteria. It was seen that 435 out of 631 genes had annotation of biological processes, with 120 genes (27.6%) involved on nucleotide and amino acid metabolism, 78 genes (17.9%) involved on transcriptional regulation, 77 genes (17.7%) involved on cellular signaling, 44 genes (10.1%) involved on lipids and carbohydrates metabolism, 29 genes (6.7%) involved on cell cycle, 28 genes (6.4%) involved on cellular adhesion and cytoskeleton, 24 genes (5.5%) involved on protein synthesis and degradation, 22 genes (5.1%) involved on apoptosis and 8 genes (1.8%) involved on inflammatory processes. In a next step, we have used the *Ingenuity Pathways Analysis* 3.1 software, aiming to construct gene interaction and regulation network, being able to select the main networks modulated during the infection. Our work has identified many changes in the expression of several genes involved on the fusion of vesicles and the vesicle mediated transport, including the Rabs proteins, besides other accessories proteins from the complex; inflammatory response genes, apoptosis genes, cell cycle genes, among many others, which will be used as future research goals, to provide a deeper biological description of the infection process of *Toxoplasma gondii*.



# 1 Introdução

A Toxoplasmose é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii* Splendore 1908, um protozoário intracelular obrigatório que sobrevive em células nucleares de mamíferos e aves. Tem alta prevalência em seres humanos, podendo atingir mais de 60% da população em determinados países e no Brasil mostrando positividade que, em adultos, chegam a 80% (FERREIRA, 2001). Ele é descrito como oportunista devido à possibilidade de causar uma infecção disseminada e fatal em hospedeiros com imunodeficiência. A infecção pode ser grave também em crianças com infecção congênita, em pacientes imunodeprimidos, acometidos pelo HIV ou transplantados de órgãos, com manifestações sistêmicas ou de comprometimento de diferentes órgãos, como pulmão, sistema nervoso central e fígado.

Atualmente, através dos recursos biotecnológicos, da bioinformática, de técnicas revolucionárias envolvendo análises mais detalhadas em nível molecular e de organização genômica, novos métodos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico molecular, para estudos ligados ao metabolismo, ao sistema fisiológico do parasita e do hospedeiro. Tais métodos enfocam também o sistema imunológico inato e adaptativo na tentativa de descobrir elementos específicos das relações parasita-hospedeiro. Através de construções de modelos moleculares, tem sido estimulada a produção de fármacos que bloqueiem e/ou estabilizem o processo infectivo do parasita, que vem se revelando importante para a saúde pública e para o controle das doenças parasitárias.

O grande sucesso adaptativo do parasita depende de proteínas específicas, organelas especializadas e estruturas peculiares do citoesqueleto, além de outros sistemas que colaboram de forma eficiente na interação harmoniosa e silenciosa do *Toxoplasma gondii* com a célula hospedeira. Nesses processos estão envolvidas redes de interação de proteínas e sinais químicos que modulam estruturas na célula hospedeira, permitindo a formação de um ambiente propício para a replicação do parasita.

Visando aprofundar o conhecimento do processo de interação entre o parasita e a célula hospedeira, este trabalho tem como objetivo descrever as mudanças de um tipo específico de célula hospedeira, aumentando o entendimento do processo de forma a compreender a regula-

ção e o controle transcricional dos genes utilizando a tecnologia de microarranjos, uma técnica poderosa através da qual se pode avaliar de uma forma ampla os processos celulares, através do perfil da expressão gênica em larga escala, envolvidos na resposta de uma célula hospedeira frente a uma infecção.

## **1.1 Conhecimentos gerais**

### **1.1.1 Enquadramento taxionômico do parasita**

FILO: APICOMPLEXA

CLASSE: SPOROZOEIA

SUBCLASSE: COCCIDIASINA

ORDEM: EUCCOCCIIDA

FAMÍLIA: SARCOCYSTIDAE

GÊNERO: *Toxoplasma* (do grego: forma de arco)

ESPÉCIE: *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório que foi primeiramente descrito em 1908 por Nicolle e Maceaux trabalhando com roedores no Norte da África e, no mesmo ano, por Splendore, com coelhos no Brasil. O nome originou-se da espécie de roedor africano *Ctenodactylus gondii* de onde o parasita foi isolado. O nome do gênero é derivado da palavra *Toxon*, de origem grega que representa o arco, em referência à forma de meia lua do parasita (BLACK & BOOTHROYD, 2000).

Todos os representantes deste filo são parasitos obrigatórios. Caracterizam-se por possuir, em determinadas fases da vida, uma estrutura chamada complexo apical. Este complexo localiza-se no pólo anterior de seu corpo alongado e destina-se a sua fixação e penetração nas células dos hospedeiros. A classe Sporozoea se caracteriza por possuir um complexo apical bem desenvolvido, presença de microgametas flagelados e oocistos. Reproduzem-se de forma assexuada e sexuada e locomovem-se por flexão do corpo, por deslizamento ou por ondulações. Nos organismos membros da ordem Eucoccidiida seu ciclo apresenta merogonia e são parasitos de vertebrados e invertebrados. O *Toxoplasma*, além de dispor de uma estrutura celular polarizada, cito-

esqueleto complexo e distribuição de organelas especializadas na região apical (BLACK & BORTHROYD, 2000), contém um plastídeo ou apicoplasto, organela de origem endossimbiótica filogeneticamente próxima às algas verde, indispensável para a vida do parasita (WALLER *et. al.*, 1998).

### **1.1.2 Morfologia e habitat**

O *T. gondii* pode ser encontrado em vários tecidos e células, com exceção das hemácias; e líquidos orgânicos, como saliva, leite, líquido peritoneal, dentre outros. Nos felinos não imunes as formas do ciclo sexuado podem ser encontradas no epitélio intestinal e posteriormente liberados junto com as fezes desses animais, após completar a fase intestinal. Assim sendo, o parasita apresenta uma morfologia múltipla, dependendo do habitat e do estado evolutivo. As principais formas que o parasita apresenta durante o ciclo evolutivo são: taquizoítos, bradizoítos e oocistos.

- **Taquizoíto:** O termo “taquizoíto” (tachos = rápido em Grego) foi proposto por Frenkel em 1973 e descrito como o estágio de multiplicação rápida que ocorre no hospedeiro. Esse termo substituiu o termo anteriormente usado Trofozoítos (DUBEY, *et. al.*, 1998). Essa forma pode ser encontrada dentro do vacúolo citoplasmático (vacúolo parasitóforo) de várias células, como nos líquidos orgânicos, excreções e secreções, células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosas e musculares. Os taquizoítos são pouco resistentes ao suco gástrico no qual são destruídos em pouco tempo. Foi a primeira forma descrita e o seu aspecto morfológico (figura 1.1) deu o nome ao gênero. Apresenta-se com forma aproximada meia-lua com uma extremidade afilada e outra arredondada, medindo aproximadamente, 4 a 9  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, onde o núcleo se encontra na posição relativamente central. Quando corado pelo método de Giemsa apresenta-se com citoplasma azulado e núcleo vermelho.
- **Bradizoíto:** É a forma encontrada em vários tecidos (musculares esqueléticos e cardíacos, nervoso, retina), geralmente durante a fase crônica da infecção, sendo também denominada cistozoíto (figura 1.2). Os bradizoítos são encontrados dentro do vacúolo parasitóforo de uma célula, medindo, aproximadamente 7 por 1,5  $\mu\text{m}$  cuja membrana forma a cápsula do cisto tecidual (MEHLHORN & FRENKEL, 1980; DUBEY, *et. al.*, 1998) . Os

bradizoítos se multiplicam lentamente (brady = lento em Grego) dentro do cisto por endodiogenia. O tamanho do cisto é variável, dependendo da célula parasitada e do número de bradizoítos em seu interior, podendo atingir até 300 µm. Os bradizoítos são muito mais resistentes à digestão com tripsina ou pepsina do que os taquizoítos e podem permanecer viáveis nos tecidos a vida inteira.

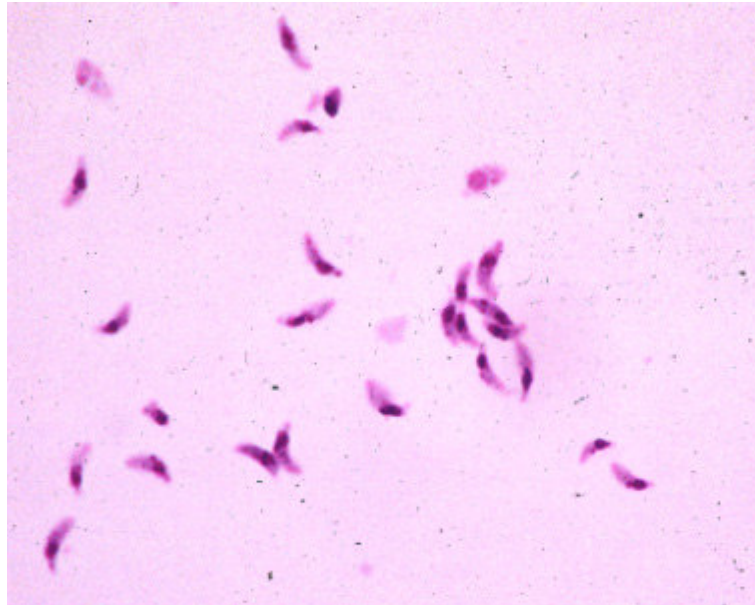


Figura 1.1. Taquizoítos de *T. gondii*.

Fonte (<http://cvm.msu.edu/courses/mic569/docs/parasite/TOXO.HTML>)

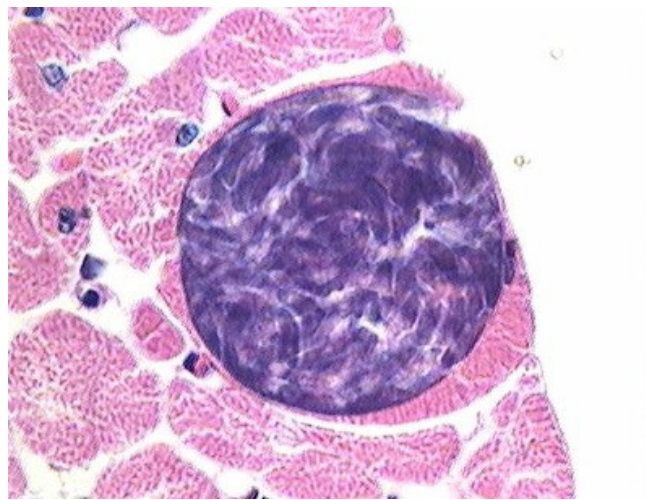


Figura 1.2. Bradizoítos encistados em tecido muscular.

Fonte (<http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Toxoplasma.htm>).

- **Oocisto:** é a forma de resistência, possuindo uma parede bastante resistente às condições do meio ambiente. Os oocistos são produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e são eliminados junto com as fezes. Os oocistos são esféricos medindo cerca de 12 µm de diâmetro, possuindo uma parede dupla contendo em seu interior 2 esporocistos, cada um com 4 esporozoítos (NEVES, 1985; DUBEY, 1993).

### 1.1.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico do *T. gondii* desenvolve-se em duas fases distintas:

- **Fase assexuada:** ocorre nos tecidos dos vários hospedeiros mamíferos, inclusive felinos, e aves;
- **Fase sexuada:** ocorre no epitélio intestinal de gatos jovens (e outros felinos) não imunes.

Dessa forma, vemos que *T. gondii* apresenta um ciclo heteroxeno, no qual os gatos são hospedeiros completos ou definitivos, pois possuem o ciclo sexuado, no epitélio intestinal, e o ciclo assexuado, nos outros tecidos. Já o ser humano, outros mamíferos e aves são os hospedeiros incompletos ou intermediários, pois só possuem o ciclo assexuado.

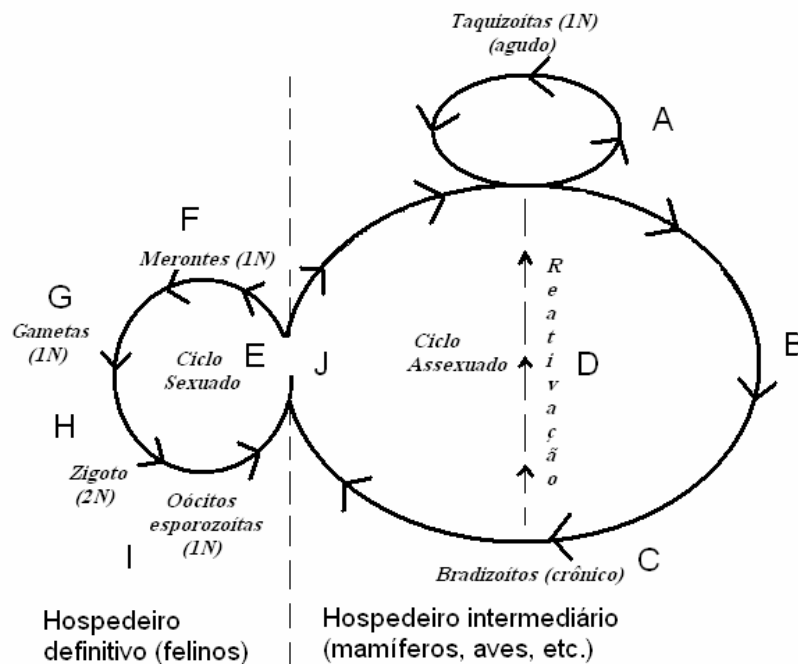


Figura 1.3. Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* envolvendo a fase sexuada e assexuada.

Modificado de Smith & Parsons, 1996

### 1.1.3.1 Fase assexuada

Um hospedeiro susceptível, ingerindo oocistos maduros contendo esporozoítos ou entrando em contato com taquizoítos eliminados em secreções, ou ainda, taquizoítos ou cistos contendo bradizoítos encontrados na carne crua, poderá adquirir o parasita e desenvolver a fase assexuada (figura 1.3, passo J). As formas de taquizoítos que chegam ao estômago são destruídas, mas as que penetram na mucosa oral evoluem do mesmo modo que os oocistos e cistos.

Cada taquizoíto, esporozoíto ou bradizoíto sofre intensa multiplicação, após rápida passagem pelo epitélio intestinal e entrada no vacúolo citoplasmático de vários tipos de células do organismo, na chamada fase proliferativa. Com esse aumento no número de parasitos, a célula infectada se rompe, liberando novos taquizoítos livres na linfa ou no sangue circulante, provocando um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade das formas infectantes adquiridas, cepa do parasita e da resistência do hospedeiro. Essa fase inicial da infecção caracteriza a fase aguda da doença (figura 1.3, passo A). Neste ponto, a evolução pode levar à morte do hospedeiro, raramente, ou cessar pelo aparecimento de anticorpos específicos (figura 1.3, passo B). Com o aparecimento da imunidade, os parasitas extracelulares desaparecem do sangue, da linfa e dos órgãos viscerais, e há uma diminuição da multiplicação intracelular. Os parasitas resistentes evoluem para a forma de cistos. Esta fase cística, juntamente com a diminuição da sintomatologia, caracteriza a fase crônica (figura 1.3, passo C). Essa fase pode permanecer por longo tempo ou, por mecanismos ainda não muito bem conhecidos, envolvendo a diminuição da imunidade ou da resistência, alteração hormonal, por exemplo, ocorre a reagudização (figura 1.3, passo D), com sintomatologia semelhante à primo-infecção (SMITH & PARSONS, 1996). Os mecanismos da reprodução assexuada são os seguintes:

- **Endodiogenia:** Forma de multiplicação assexuada especializada onde um parasita divide o seu núcleo e o seu citoplasma, dentro de sua membrana. Dessa forma, a membrana citoplasmática envolve dois taquizoítos-filhos, resultando dois taquizoítos semelhantes;
- **Endopoligenia:** Representa o mesmo processo anteriormente descrito, porém, mais rápido e com maior formação de taquizoítos (DUBEY, *et. al.*, 1998).

A formação dos cistos ocorre por um desses dois processos descritos. Entretanto, além da membrana citoplasmática materna, o parasita agrega à membrana uma camada granular, com a finalidade de intensificar sua proteção.

### 1.1.3.2 Fase sexuada

O ciclo sexuado ocorre somente nas células epiteliais, principalmente do intestino delgado de gato e de outros felinos jovens. São, por isso, considerados hospedeiros definitivos. Assim, um gato jovem e não imune, infectando-se oralmente por taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos, desenvolverá o ciclo sexuado (figura 1.3, passo E; figura 1.4). O tempo decorrido dessa infecção até o aparecimento de novos oocistos em suas fezes, denominado período pré-patente, dependerá da forma ingerida, variando entre 3 e 10 dias, para cistos, 18 dias ou mais após ingerir oocistos e 13 dias ou mais após ingerir taquizoítos (DUBEY, *et. al.*, 1998).

Após a ingestão de tecido encistado pelo gato, a parede do cisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado. Após a liberação dos bradizoítos ocorre a penetração do parasita dentro das células epiteliais do intestino delgado iniciando o desenvolvimento de numerosos *T. gondii*. Cinco tipos morfológicamente distintos de *T. gondii* se desenvolvem nas células epiteliais do intestino antes de iniciar a gametogonia. Estes estágios diferenciados são designados tipo A a E. Pouco se tem estudado sobre a estrutura e a biologia dos tipo A, B e C desde a descrição original por Dubey e Frenkel em 1972 (DUBEY, *et. al.*, 1998).

Após o desenvolvimento assexuado (tipo A a E), o ciclo sexual inicia dois dias após ingestão de tecidos contaminados de bradizoítos pelo gato. Por esquizogonia (endodiogonia dos esquizontes), os esquizontes irão produzir os merozoítos, que ficarão contidos dentro dos merócitos. O conjunto desses merozoítos formados dentro do vacúolo citoplasmático da célula é denominado meronte ou esquizonte maduro (figura 1.3, passo F). O rompimento da célula parasitada libera os merozoítos (figura 1.4, item 7) que penetrarão em novas células epiteliais e se transformarão nas formas sexuadas masculinas e femininas (figura 1.3, passo G; figura 1.4, itens 8 a 10, e 12 a 14): os gametócitos ou gamontes, que após um processo de maturação formarão os gametas masculinos, microgametas móveis com 2 flagelos (figura 1.4, itens 12 a 14), e femininos, macrogametas imóveis (figura 1.4, itens 8 a 10). A origem dos gamontes não é bem caracterizada, mas merozoítos são liberados de esquizontes do tipo D e E, provavelmente iniciando a formação dos gametas. O macrogameta permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto que

os microgametas móveis sairão de sua célula e irão fecundar o macrogameta, formando o ovo ou zigoto (figura 1.3, passo H; figura 1.4, itens 16, 11 e 15). Este evoluirá dentro do epitélio, formando uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto (figura 1.3, passo I; figura 1.4, item 17). Depois, a célula epitelial, em alguns dias, sofrerá rompimento, liberando o oocisto imaturo (figura 1.3, passo J; figura 1.4, item 18). Essa forma, através das fezes, alcançará o meio externo e, após um período de cerca de quatro dias, ficará maduro e apresentará 2 esporocistos, contendo cada um 4 esporozoítos (figura 1.4, item 19). O felino jovem é capaz de eliminar oocistos durante um mês, aproximadamente. O oocisto, em condições de umidade, temperatura, luminosidade e local favoráveis, é capaz de se manter infectante por cerca de 12 a 18 meses (DUBEY, *et. al.*, 1998).

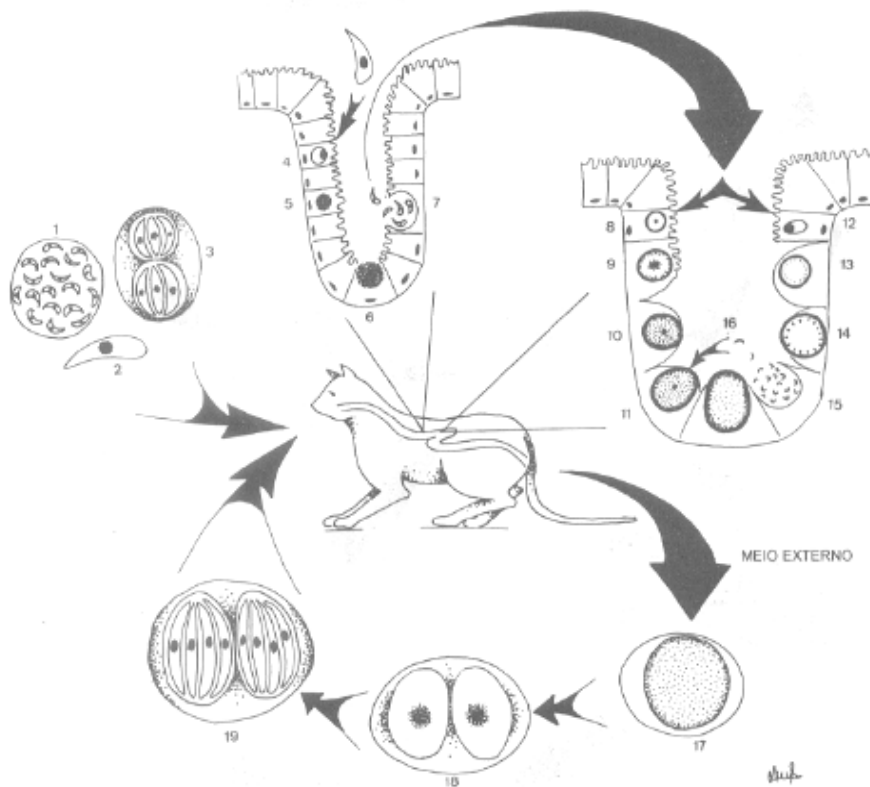


Figura 1.4. Representação do ciclo sexual no gato não-imune.

- 1,2 e 3 são formas infectantes do *T. gondii*; (1) forma cística; (2) forma taquizoíta; (3) forma oocística;  
 (4) penetração das formas bradizoíta ou esporozoíta na célula do epitélio intestinal; (5 e 6) esquizonte imaturo;  
 (7) esquizonte maduro liberando os merozoítos; (8 a 10) formação do gameta; (12 a 14) formação dos microgametas;  
 (16) momento da fecundação do (11) macrogameta pelo (15) microgameta móvel;  
 (17) oocisto não esporulado liberado nas fezes do gato; (18) esporulação do oocisto;  
 (19) oocisto maduro pronto para infectar. Fonte (Iglésias, 1997).



### **1.1.4 Epidemiologia**

A toxoplasmose é universalmente disseminada infectando o ser humano com altos níveis de prevalência. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a prevalência é de 60% na população mundial.

Em um estudo mundial de mulheres gestantes foi reportada a soroprevalência de 7 a 51% e em mulheres com gestação anormais e abortos a soroprevalência variava de 18,2 a 44,8% (GALVAN *et al.*, 1995).

Os registros de infecções por *T. gondii* em humanos, avaliados por levantamentos sorológicos realizados em diversos países, é alto. Nos Estados Unidos, a prevalência de anticorpos anti-toxoplasma varia de 1 a 30%, na Inglaterra é menos de 0,1% em crianças com menos de um ano e 45% em indivíduos com mais de 50 anos. Na França foram observados índices de 80 a 90% de infectados o que poderia estar relacionado ao hábito de comer carne com pouco cozimento (DESMONTS & COUVREUR, 1974). A incidência da toxoplasmose congênita é estimada nos Estados Unidos em torno de 3.000 crianças nascidas anualmente. Na França e Áustria a incidência excede 30 por 1000 nascimentos. Foi reportada uma prevalência de 14,5% em felinos nos Estados Unidos e 78,1% em Beirute. Em Beirute, cães obtiveram soroprevalência de 30% (DUBEY *et al.*, 1990).

Em suínos a prevalência de anticorpos anti-toxoplasma é de 69% em levantamento realizado em 1990 nos Estados Unidos, e 31,8% em levantamento realizado em suínos abatidos no Estado do Paraná (DIAS *et al.*, 2005).

No Brasil, vários levantamentos em adultos mostram positividade de 50 a 80%. Na cidade do Rio de Janeiro, em 1987, observou-se positividade de 32% em crianças de até 5 anos, 59% de 6 a 10 anos, 69% de 11 a 15 anos e 71% em pessoas de 16 a 20 anos de idade (SOUZA *et al.*, 1987). Em levantamento sorológico em ovinos criados no Estado de São Paulo, foi observada positividade para anticorpos anti-toxoplasma de 22,5% da população (GUIMARÃES *et al.*, 1993). Em Campos de Goytacazes, norte do estado do Rio de Janeiro, foi constatado através de testes sorológicos que 84% da população incluída nos grupos socioeconômicos mais baixos era soropositiva, comparado com os 62% e os 23% dos grupos socioeconômicos médios e superiores, respectivamente. Uma possível causa desta alta prevalência é o mau tratamento da água utiliza-

da para o consumo, indicando a importância potencial da transmissão de oocistos pela água (OLIVEIRA *et. al.*, 2003).

### **1.1.5 Transmissão**

A infecção pelo *T. gondii* constitui a zoonose mais difundida no mundo (NEVES *et al.*, 2000). Em todos os países, grande parte da população humana e animal (mais de 300 espécies de animais, entre mamíferos e aves – domésticos ou silvestres) apresentam parasitismo pelo *T. gondii*. Essa variação da prevalência parece ser definida por fatores geográficos, mesológicos, climáticos, hábitos alimentares, tipo de trabalho e até mesmo a uma pré-disposição genética do indivíduo, indicando que os mecanismos de transmissão devem ser vários: oocistos em fezes de gato jovem infectado, ingestão de cistos presentes em carnes e alimentos contaminados, encontrados no leite, mecanicamente pela picada de insetos hematófagos e congenitamente.

O homem adquire a infecção por três vias principais:

- Ingestão por manipulação e infecção de oocistos presentes em jardins, caixa de areia, latas de lixo, na água e ou alimentos ou disseminados mecanicamente por moscas, baratas, minhocas, entre outros;
- Ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal cozida, especialmente do porco e do carneiro, onde os cistos resistem por semanas ao frio, mas o congelamento a 0°C ou o aquecimento acima de 60°C os mata;
- Congênita ou transplacentária, onde cerca de 40% dos fetos podem adquirir o *T. gondii* durante a gravidez, estando a gestante na fase aguda da doença (GAGNE, 2001). Em vista das possíveis anomalias que podem ocorrer no feto, a transmissão congênita é a mais grave. As vias de infecção para o feto podem ser:
  - **Transplacentária:** quando a gestante adquire a toxoplasmose durante a gravidez, a partir do segundo mês da gestação, apresentando a fase aguda da doença, poderá transmitir *T. gondii* ao feto, tendo provavelmente os taquizoítos como formas responsáveis;
  - **Rompimento de cistos no endométrio:** apesar de a mãe apresentar a doença na fase crônica, alguns cistos localizados no endométrio poderiam romper-se, pela

distensão mecânica ou ação lítica das vilosidades coriônicas, liberando os taquizoítos que penetrariam no feto;

- **Taquizoítos livres no líquido amniótico:** os taquizoítos presentes no líquido amniótico atingiriam o feto (GAGNE, 2001).

### **1.1.6 Patogenia**

É do conhecimento dos especialistas que o número de pessoas com sorologia positiva para *T. gondii* é muito grande, sendo talvez o protozoário mais difundido na população humana e animal, incluindo as aves e mamíferos. A patogenia na espécie humana parece estar ligada a alguns fatores importantes, tais como cepa do parasita, resistência imunológica do indivíduo e o modo pelo qual ela se infecta. A patogenicidade da toxoplasmose humana, dependente da virulência da cepa. Experimentos realizados com *T. gondii* (BOOTHROYD & GRIGG, 2002), oriundos de casos humanos e inoculados em animais de laboratório, algumas cepas que eram letais em poucos dias e outras que apenas provocavam emagrecimento, anemia, queda de pêlo e com posterior restabelecimento do animal.

#### **1.1.6.1 Toxoplasmose congênita ou pré-natal**

As conseqüências da toxoplasmose materna para o feto dependerão do grau de exposição do feto aos toxoplasmas, da virulência da cepa e do período da gestação. Assim sendo, as gestantes na fase aguda, ou reagudizada, da doença podem abortar o feto, produzir partos precoces ou a termo, com os recém-nascidos podendo apresentar anomalias graves, que podem até mesmo levar à morte. Sabe-se que 40% a 50% dos fetos infectados acabam morrendo (GAGNE, 2001).

As alterações ou lesões fetais mais comuns devidas à toxoplasmose na gravidez variam conforme o período da gestação:

- **Primeiro trimestre da gestação:** nessa etapa, pode ocorrer aborto, sendo que dados estatísticos indicam que a freqüência de aborto é 10 vezes maior em gestantes com sorologia positiva;
- **Segundo trimestre da gestação:** aborto ou nascimento prematuro, podendo a criança apresentar-se normal ou com anormalidades graves típicas, descritas por Sabin, caracteri-

zadas por coriorretinite, calcificações cerebrais, perturbações neurológicas, como retardamento psicomotor e alterações do volume craniano;

- **Terceiro trimestre da gestação:** o feto pode nascer normal e apresentar evidências da doença em alguns dias, semanas ou meses após o parto. Nesta situação, a toxoplasmose pode ser multiforme, mas em geral há um comprometimento ganglionar generalizado, hepatoesplenomegalia, edema, miocardite, anemia, trombocitopenia e lesões oculares, as quais são patognomônicas. Taquizoítos atingem a coróide e a retina, uni ou bilateralmente, provocando inflamação e degeneração em graus variáveis que, ao exame oftalmológico, recebe o nome de “foco em roseta”. Algumas vezes, essa infecção congênita da retina provoca alterações no recém-nascido, uma vez que mecanismos imunes determinam o encistamento das formas. Posteriormente, já na idade adulta, poderá haver uma eventual reagudização das formas latentes, levando a uma toxoplasmose ocular, de origem intra-uterina. Outras alterações oculares que também podem ocorrer são microftalmia, nistagmo, estrabismo, catarata e irite. Portanto, a toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença, em geral provocando sintomas variados, mas comumente enquadrados dentro da “tétrade de Sabin”.

#### 1.1.6.2 Toxoplasmose pós-natal

A toxoplasmose pós-natal pode se apresentar desde casos benignos ou assintomáticos, que são a grande maioria, até casos fatais. Entre esses dois extremos, há uma variada gama de situações, dependendo da localização do parasito:

- **Ganglionar ou febril aguda:** É a forma mais freqüente, encontrada tanto em crianças como em adultos. Há um comprometimento ganglionar, que pode ser generalizado, com febre alta. Geralmente é de curso crônico e benigno, podendo às vezes levar a complicações de outros órgãos (NEVES *et al.*, 2000).
- **Ocular:** A retinocoroidite é a lesão mais freqüente associada à toxoplasmose, uma vez que 30% a 60% dos casos se devem ao *T. gondii*. É consequência de uma infecção aguda com a presença da taquizoítos ou crônica com presença de cistos contendo bradizoítos localizados na retina. A toxoplasmose ocular ativa consiste em um foco coagulativo e necrótico bem definido da retina. Além disso, pode estar presente uma inflamação difusa da retina e da coróide. Antígenos de *T. gondii* são freqüentemente detectados em áreas de

necrose através da imuno-histoquímica. Em pacientes com AIDS, somados a lesões discretas ou multifocais, pode estar presente uma necrose difusa da retina associada com leve inflamação e grande número de parasitas. As lesões podem evoluir para uma cegueira parcial ou total, sendo as bordas das lesões freqüentemente hiperpigmentadas como resultado da ruptura do pigmento retinal do epitélio. Parece que o *T. gondii* alcança a retina através da corrente sangüínea na forma de taquizoítos livres ou taquizoítos residindo dentro de macrófagos circulantes, temporariamente seqüestrados para dentro dos capilares da retina. Esses taquizoítos são liberados quando as células infectadas são lisadas e podem invadir a retina adjacente (LABALETTE, *et. al.*, 2002).

- **Cutânea ou exantemática:** Forma lesões generalizadas na pele, mas é rara. Os casos conhecidos foram de evolução rápida e fatal (NEVES *et al.*, 2000).
- **Cerebroespinal ou meningoencefálica:** Era entidade pouco freqüente em indivíduos imunocomprometidos, porém com o surgimento da AIDS a freqüência aumentou consideravelmente, em decorrência da reativação de formas císticas encontradas em indivíduos com infecções latentes. Este risco, para indivíduos imunodeficientes com sorologia positiva para a toxoplasmose, é estimado em cerca de 25%. Os parasitas, atacando as células nervosas provocam lesões focais múltiplas, principalmente no hemisfério cerebral, área fronto-parietal, ou gânglio basal e no cerebelo. Como conseqüências, provocam cefaléia, febre, anomalias focais manifestando hemiparesia leve até perda da capacidade de coordenação muscular, confusão mental, convulsões, letargia, que pode progredir para estupor, coma, até a morte do paciente. Em alguns doentes, foram constatadas manifestações de delírio e alucinação visual (GAGNE, 2001).
- **Generalizada:** É uma forma rara, mas de evolução fatal em indivíduos com resposta imune normal. Em imunocomprometidos, têm sido registrados alguns casos de toxoplasmose sistêmica, com comprometimento meningoencefálico, miocárdico, pulmonar, ocular, digestivo e testicular.

### ***1.1.7 Diagnóstico laboratorial***

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasita. Segundo as características imunoquímicas destes anticorpos,

diferentes marcadores sorológicos têm sido descritos para distinguir entre infecção latente, comum na população, e infecção recente. Outras respostas se esperam, também, da sorologia, como datar na gestante seu contágio pelo *Toxoplasma* ou, no imunocomprometido, a reagudização de uma toxoplasmose latente. Por tais implicações e ponderações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se como uma das mais complexas, em contínua evolução, invocando assim, outros métodos auxiliares e mais sensíveis, existindo uma variedade de testes e experiências para a interpretação dos resultados. Entretanto, a evidenciação do parasita por isolamento a partir de material do paciente, ou pela demonstração de seus componentes, como antígenos ou segmentos do DNA é de alto valor diagnóstico, especialmente nos imunodeficientes ou transplantados, ou por imunoimaturidade, como no feto e no recém-nascido. Atualmente, delinea-se a possibilidade de utilização da pesquisa da imunidade celular para fins diagnósticos, especialmente na toxoplasmose congênita (FERREIRA & ÁVILA, 2001). Através de estudos de diferentes manifestações infecciosas da toxoplasmose há evidências de que não somente o estado imune, mas também a predisposição genética do indivíduo influencia o resultado clínico da infecção do *T. gondii* (KEMPF *et. al.*, 1999).

O diagnóstico da toxoplasmose é usualmente baseado na sorologia. Outros exames relacionados são realizados, como a partir do isolamento do *T. gondii* em camundongos; isolamento em culturas de células como fibroblastos humanos, evidenciado por imunofluorescência, pesquisa de antígenos parasitários utilizando anticorpos específicos e coloração imunofluorescente e imunoenzimática. Em casos onde a sorologia é duvidosa recomenda-se, atualmente, a utilização de métodos moleculares (BASTIEN, 2002). Estudos feitos na comparação de PCR, captura pelo ELISA e testes imunológicos com camundongos infectados pelo *T. gondii* mostrou que a análise por PCR foi a mais sensível dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico (HAFID *et. al.*, 2001). O método molecular utilizado para o diagnóstico da doença da Toxoplasmose Pré-Natal é o teste de DNA Qualitativo Pré- Natal de *Toxoplasma gondii*, que é realizado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), em um teste multiplex, onde se utiliza três pares de primers, sendo dois específicos para o *T. gondii* e um segmento de gene humano de cópia simples para controle interno da extração e amplificação. Para isso, pode-se utilizar células contidas no líquido amniótico, sangue fetal ou restos ovulares.

## 1.2 O parasita

### 1.2.1 Cepas de *T. gondii*

Existem três linhagens clonais distintas para o *T. gondii* designadas tipo I (como exemplos as cepas RH e GT-1), tipo II (cepas ME49, PDS, PLK, PTg) e tipo III (cepas CEP, VEG), podendo cada genótipo em particular diferir na capacidade de induzir a patologia ou ocorrência numa espécie particular de animal. Estas cepas foram completamente ou parcialmente seqüenciadas (ME49 e RH, <http://www.toxodb.org>), fazendo parte dos projetos de sequenciamento de ESTs (ME49, RH, VEG) e estudos de genotipagem, com mais de 130 marcadores (GT-1, CEP, ME49, <http://www.toxomap.wustl.edu>) (SAEIJ *et. al.*, 2005).

A virulência do parasita é normalmente baseada na LD<sub>50</sub> em camundongos. Pouco se conhece a respeito da correlação entre virulência do *T. gondii* em camundongos comparados com outras espécies. Muitos estudos têm investigado a correlação entre o genótipo e as manifestações de doenças em humanos. Notavelmente, apenas o tipo I e algumas cepas incomuns foram encontrados em indivíduos imunocomprometidos desenvolvendo severa toxoplasmose ocular nos USA (GRIGG, *et. al.*, 2001). Isso é inesperado, pois o tipo II domina as infecções humanas neste país. O tipo I também tem sido associado à toxoplasmose congênita severa na Europa (HOWE *et. al.*, 1997; FUENTES *et. al.*, 2001).

Capacidades de migração distintas das diversas cepas podem contribuir na disseminação do parasita e acessos a lugares imunoprivilegiados, como o sistema nervoso central. BARRAGAN & SIBLEY (2002) demonstraram que uma sub-população do tipo I de parasitas tem uma alta taxa de migração *in vitro* comparada com a do tipo II e tipo III. Quando estes parasitas são clonados é visto um fenótipo de migração à longa distância (LDM). *In vivo*, parasitas RH LDM migram mais efetivamente em células do baço em relação as do tipo II ou tipo III de parasitas.

A carga de parasitas é o maior contribuinte da patogenicidade da toxoplasmose em camundongos (MORDUE *et. al.*, 2001; GAVRILESCU & DENKERS, 2001), relacionado com a reestimulação do sistema imune levando a níveis altos de citocinas das células Th1, aumentando a apoptose celular.

As diversas cepas de *T. gondii* também diferem na habilidade de atrair tipos particulares de células para a infecção. É interessante observar que embora os parasitas sejam raramente en-

contradas dentro dos neutrófilos, significativamente mais parasitas do tipo I foram encontrados dentro destas células do que as do tipo II. Assim, diferindo a habilidade de crescimento de várias cepas de *T. gondii* em neutrófilos podendo explicar a diferença de alcançar uma carga de parasitas associadas com a patologia e a morte do hospedeiro (SAEIJ *et. al.*, 2005).

## 1.2.2 Ultra-estrutura

### 1.2.2.1 Organelas secretórias

Sendo um parasita intracelular obrigatório, não é surpreendente que o *T. gondii* tenha um número regulado de organelas secretórias (NGO *et. al.*, 2000). Essas estruturas são mostradas de forma comparativa entre taquizoíto e bradizoíto na figura 1.5. Dispostos na região apical estão os micronemas e as roptrias e, mais distribuídos, estão os grânulos densos. Cada compartimento destas organelas secretoras contém proteínas cuja função é consistente com o tempo e o processo de invasão (CARRUTHERS & SIBLEY, 1997). Ocorre um processo coordenado de estimulação destas organelas no parasita para a liberação destas proteínas durante todo o processo de invasão o qual é muito rápido. A descarga das proteínas dos micronemas ocorre no início do processo de adesão e invasão. Logo após as proteínas das roptrias e finalmente as do grânulo denso são liberadas, completando a invasão.

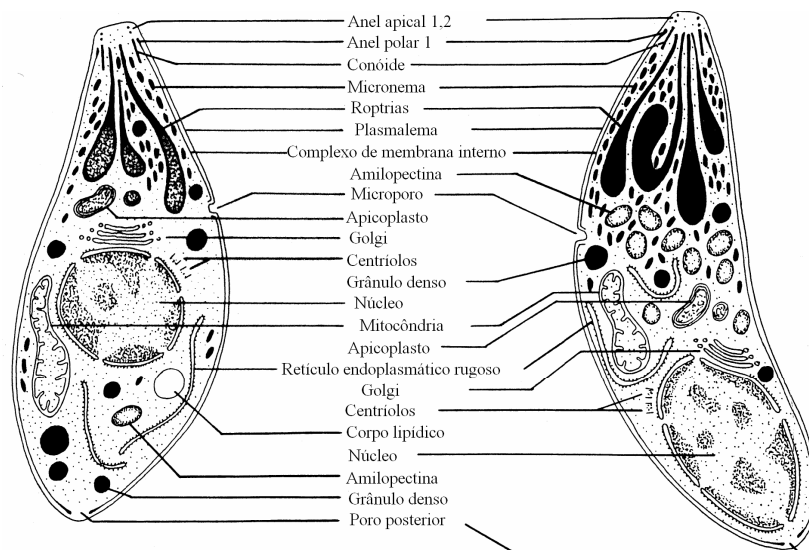


Figura 1.5. Desenho esquemático de taquizoíto e bradizoíto de *T. gondii*.

Fonte: DUBEY *et. al.*, 1998, modificado



### 1.2.2.2 Citoesqueleto

O citoesqueleto do *T. gondii* é formado por um arranjo complexo de microtúbulos e outras macromoléculas estruturais que aparentemente envolvem e proporcionam a integridade estrutural e permitem que parasita deslize sobre superfícies e invada as células do hospedeiro (NICHOLS & CHIAPPINO, 1987; FRIXIONE *et. al.*, 1996; MORRISSETTE *et. al.*, 1997). Na região anterior da célula, dois anéis pré-conoidais (anel apical 1 e 2) rodeiam o topo numa estrutura tubular chamada conóide (figura 1.6 e 1.7). O conóide consiste de 14 elementos de composição pouco conhecida, formando um espiral anti-horário que se dirige para a região posterior. O conóide é formado basicamente de tubulina (HU *et. al.* 2002), sendo que dois microtúbulos de aproximadamente 400 nm de comprimento se estendem dos anéis pré-conoidais e passam através do centro do conóide. Estes túbulos são ligados um ao outro e são embutidos na matriz densa sendo associados à região apical com as roptrias e micronemas. Foi descrito que a função destes microtúbulos está diretamente ligada a essas organelas passando junto do conóide e colaborando com a secreção destes constituintes na região apical do parasita (NICHOLS & CHIAPPINO, 1987).

Na região posterior ao conóide, o anel polar 2 funciona como um centro organizador dos microtúbulos onde 22 microtúbulos percorrem em espiral cerca de dois terço do corpo do parasita (RUSSELL & BURNS, 1984). A actina tem sido detectada no conóide, anéis pré-conoidais e microtúbulos subpeliculares por imuno-eletromicroscopia.

A actina é codificada por apenas um único gene no *T. gondii* e é encontrada na forma monomérica, forma solúvel no citoplasma. O *T. gondii* tem uma proteína de ligação a actina chamada toxofilina, a qual seqüestra a actina-G e desempenha um papel chave na função de montagem e funcionamento dos filamentos de actina (POUPEL *et. al.*, 2000). A miosina, uma mecanoproteína que interage com a actina, co-localiza-se com essa proteína na região anterior do parasita bem como ao longo do complexo de membrana interno (SCHWARTZMAN & PFEFFERKORN, 1983; DOBROWOLSKI *et. al.*, 1997).

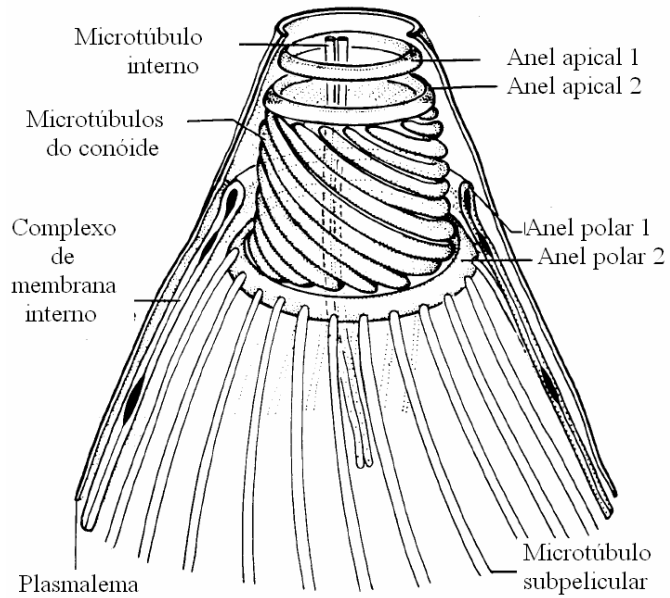


Figura 1.6. Representação esquemática do complexo apical do *T. gondii*.  
 Fonte: DUBEY al., 1998, modificado

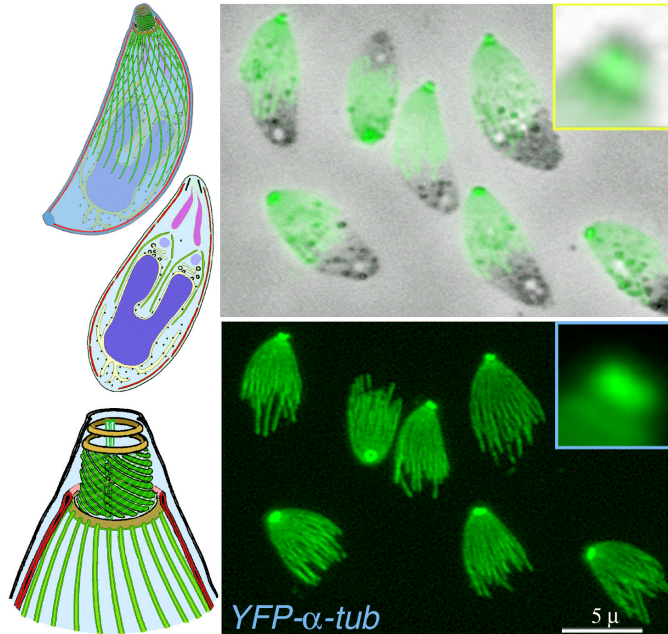


Figura 1.7. Citoesqueleto de tubulina (*T. gondii*).

O *T. gondii* utiliza o citoesqueleto de tubulina formando uma máquina molecular envolvida na invasão celular. Marcação da alfa tubulina com YFP (yellow fluorescent protein).

Fonte: [www.med.upenn.edu/cellbio/faculty/murray/](http://www.med.upenn.edu/cellbio/faculty/murray/)

### 1.2.2.3 Película trimembranária

*T. gondii* é membro do sub-reino dos Alveolatas, por possuir um complexo interno de membrana (IMC) consistindo de uma membrana lisa abaixo da membrana plasmática (OGINO & YONDEDA, 1966). Nos Apicomplexa, esta estrutura é denominada película trimembranária (duas membranas constituintes do IMC e uma sendo a membrana plasmática). Essa película inicia na região anterior aos anéis pré-conoidais e segue até a região posterior final da célula (DUBREMETZ & TORPIER, 1978). Aparentemente existe apenas uma interrupção neste complexo que é o microporo, na qual se posiciona na região central da membrana plasmática (figura 1.8). Supõe-se que este poro seja um centro ativo de endocitose (NICHOLS *et. al.*, 1994). A função da película ainda não foi bem determinada, embora seja associada com os microtúbulos sugerindo estar envolvida na integridade estrutural e motilidade da célula.

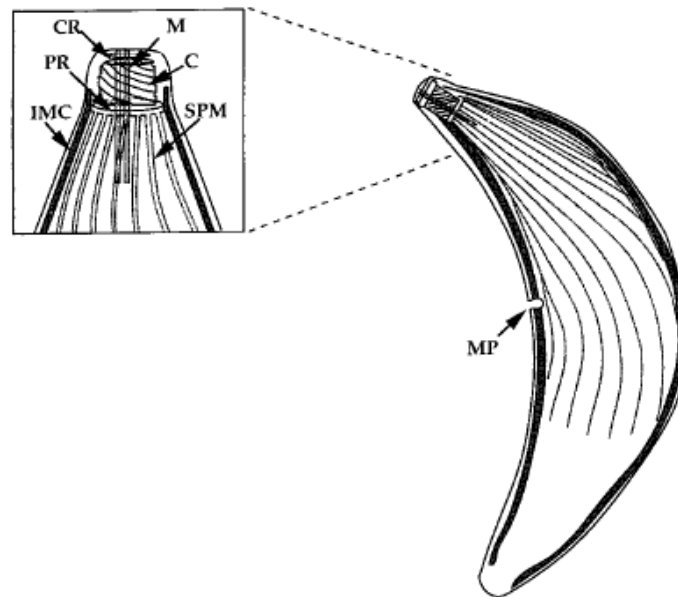


Figura 1.8. Desenho esquemático do arranjo citoesquelético do *T. gondii*.

Na região acima a esquerda da figura estão sendo ilustrados os anéis pré-conoidais (CR), conóide (C), dois microtúbulos apicais (M), e o anel polar (PR) com os 22 microtúbulos suppelicular (SPM). O IMC é localizado junto com a membrana plasmática da região anterior até o polo posterior sendo interrompido somente pelo microporo (MP) localizado no meio do corpo do parasita.

Fonte: BLACK & BOOTHROYD, 2000

## **1.3 Espectro de hospedeiros do *T. gondii***

### **1.3.1 Tipos tissulares infectados pelo parasita**

O parasita é capaz de infectar qualquer organismo homeotermo (BANETH *et al.*, 1996), invadindo todos os tipos de células nucleadas do organismo do hospedeiro (pancitotropismo), mas tendo afinidade maior pelas células do sistema fagocítico mononuclear, leucócitos e células parenquimatosas, na forma taquizoíta, e sistema nervoso central, tecido cardíaco e células musculares esqueléticas nas formas císticas – bradizoíta (DJURKOVIC-DJAKOVIC & MILENKOVIC, 2001).

### **1.3.2 Modelos murinos de infecção**

Os modelos murinos experimentais de infecção constituem uma importante ferramenta para o estudo da toxoplasmose, tanto no que diz respeito à patogênese quanto a estudos voltados ao sistema imune e nas tentativas de desenvolvimento de vacinas. Com relação à produção de vacinas, alguns trabalhos já foram publicados utilizando modelos murinos. VERCAMMEN *et al.* (2000) utilizaram três linhagens distintas de camundongos com diferentes haplótipos MHC e diferentes níveis de susceptibilidade ao *Toxoplasma gondii*: C57BL/6 (haplótipo *H-2b*), BALB/c (haplótipo *H-2d*), and C3H (haplótipo *H-2k*). Camundongos C57BL/6 são altamente susceptíveis à infecção oral, sendo que um número baixo de bradizoítos leva a alta mortalidade na fase aguda (McLEOD *et al.*, 1989). Tanto camundongos BALB/c quanto C3H podem sobreviver à infecção oral (BLACKWELL *et al.*, 1993), sendo que BALB/c pode sobreviver à infecção com números maiores de parasitas (ARAÚJO *et al.*, 1976) e a carga de cistos encontrados nos cérebros de camundongos BALB/c infectados é mais baixa do que nos camundongos C3H (BROWN *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1991).

Os modelos murinos mais utilizados para se estudar o processo de infecção por *T. gondii* são as linhagens BALB/c e C57BL/6. ROBERTS & ALEXANDER (1992) demonstraram que camundongos BALB/c podem ser usados como modelo para se estudar a infecção congênita pelo *T. gondii*. Este modelo é apropriado para testar novos agentes quimioterápicos na tentativa de impedir a transmissão vertical do parasita durante a fase aguda (FUX *et al.* 2000). Muitos traba-

lhos avaliaram o papel das células NK, CD4 e CD8, citocinas, bem como o interferon (IFN- $\gamma$ ) em modelos de camundongos *knockout* infectados com *Toxoplasma gondii* concluindo que a resposta imune celular envolvendo linfócitos T CD4, CD8 e células NK têm um papel importante na proteção primária do *T. gondii* (SUBAUSTE *et al.*, 1992; SCOTT *et al.*, 1995; SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1998; SCORZA *et al.*, 2003; ABOU-BACAR *et al.*, 2004). Trabalhos que envolvem resposta imunológica materna contra passagem placentária de parasitas (toxoplasmose congênita) em camundongos durante a primo infecção concluíram que a proteção era associada com o aumento do número células NK maternal, secreção de IFN- $\gamma$  pelo esplenócitos, diminuindo a parasitemia (ABOU-BACAR *et al.*, 2004).

A infecção via oral com *T. gondii* induz a necrose maciça das células da mucosa e células vilosas do íleo de camundongos C57BL/6 em um período de 7 dias. Estas mudanças histológicas são mediadas por células T CD4+ e envolvem mudanças imunológicas similares aquelas observadas nos modelos da doença de Crohn, que não são relacionadas aos agentes infecciosos, sugerindo que esse modelo pode ser utilizado para o melhor entendimento e desenvolvimento de terapias para essa doença. Esse modelo de infecção via oral com *T. gondii* tem a vantagem da elevada reprodutibilidade e evolui em um curto espaço de tempo (7 dias). O modelo não serve para examinar o curso da doença crônica. Entretanto, o modelo é adequado para investigar patogênese da doença inflamatória (intestinal) mediadas por respostas imunes de tipo Th1. Além disso, o modelo da infecção oral com *T. gondii* provou ser eficiente para testar substâncias anti-inflamatórias potenciais (por exemplo, anticorpos monoclonais de encontro aos subconjuntos das citocinas e células T) que é usado também em experimentações clínicas (por exemplo, anti-TNF- $\alpha$ ).

Os modelos baseados em camundongos *knockout* de genes do MHC em células T possuem potencial na identificação de genes específicos envolvidos na patogênese. A maioria dos modelos murinos de IBD (*inflammatory bowel disease*) apontam para um caminho comum de respostas imunológica dentro de uma variedade de agentes causadores, incluindo microorganismos, produtos químicos e gene *knockout* ou defeitos genéticos. Conseqüentemente, os conhecimentos combinando de modelos de IBD devem fornecer novas idéias para melhorias na prevenção e no tratamento de IBD nos seres humanos (OLIVER, 2002)

O modelo murino representa uma alternativa muito boa para o estudo da patogênese da toxoplasmose, mas outros organismos modelos também são usados. Um novo modelo modificado de embrião de galinha utilizado em estudos de doenças metastáticas tem sido usado para estudos de avaliação patológica, medições de crescimento embrionário e número de parasitas dentro das células (QUE, *et. al.*, 2004). Além disso, esse modelo está sendo muito utilizado para se testar fármacos, proporcionando uma validação direta de alvos para drogas importantes contra a toxoplasmose, como por exemplo, a toxopáina-1. Através desse modelo foi possível mostrar que a inibição específica da expressão da toxopáina-1 no parasita diminuiu em cerca de 80% o nível da infecção no cérebro e no fígado, sugerindo a importância desta proteína como mediador da infectividade do parasita, além de ser um modelo para seleção rápida e barata de compostos anti-parasíticos (QUE, *et. al.*, 2004).

## **1.4 Interação parasita-hospedeiro**

### **1.4.1 Superfície do *Toxoplasma gondii***

Para um patógeno intracelular poder invadir uma célula, primeiramente é necessário um íntimo contato com a superfície da célula. Já que a membrana lipídica da célula hospedeira e do patógeno possuem carga negativa, é necessário a interação ligante-receptor para superar esta força repulsiva. O *T. gondii* rapidamente invade uma grande variedade de tipos celulares (promiscuidade); quando cultivado *in vitro*, este parasita é capaz de invadir qualquer tipo de célula de mamífero e até mesmo células de inseto e linhagens celulares de peixe. De modo especulativo, para isso, ou o *T. gondii* tem múltiplos receptores para os diversos ligantes, ou poucos receptores para ligantes comuns aos diversos tipos celulares.

Discriminando juntos esses dois cenários, a superfície do *T. gondii* tem sido extensivamente alvo para muitos estudos na tentativa de identificar os componentes envolvidos neste processo (BOOTHROYD, 1998). A membrana plasmática parece consistir predominantemente de uma variedade de proteínas que são ligadas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) na membrana. Muitas dessas proteínas estão relacionadas à família de antígenos de superfície SAG1 (MANGER, 1998). SAG1 é a mais abundante destas proteínas de superfície envolvidas nos processos iniciais de adesão na membrana do hospedeiro (ROBERT *et. al.*, 1991; GRIMWOOD & SMITH,

1992; MINEO *et. al.*, 1993; MINEO & KASPER, 1994). Essa molécula não é a única envolvida neste acoplamento na célula hospedeira, pois parasitas com moléculas SAG1<sup>-</sup> mutantes também conseguem adentrar a célula (MINEO & KASPER, 1994).

A interação entre SAG1 e a célula hospedeira pode ser parcialmente bloqueada usando a albumina-glicosamida derivada do soro bovino como competidor (ROBERT 1991; MINEO *et. al.*, 1993; KASPER & MINEO, 1994), evidenciando a capacidade do parasita em se ligar à laminina da matriz extracelular, podendo ser usado como ponte de receptores ubíquos encontrados na célula hospedeira (FURTADO, *et. al.*, 1992a; FURTADO *et. al.*, 1992b).

#### **1.4.2 Ligantes encontrados na célula hospedeira**

Os ligantes da superfície da célula hospedeira envolvidos no processo de interação com o parasita são pouco caracterizados. Uma dessas moléculas estudada foi a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) na célula hospedeira durante a infecção por *T. gondii*. Anticorpos contra ICAM1 inibiram a transmigração do parasita através da célula implicando esse receptor no processo de invasão celular. A imunoprecipitação de ICAM1 revelou a presença de MIC2, uma proteína de adesão do parasita, indicando que esta interação ocorre com proteínas do parasita (BARRAGAN *et. al.*, 2005). A expressão dos ligantes de superfície da célula hospedeira parece também ser dependente do ciclo celular, fenômeno visto em várias linhagens celulares testadas *in vitro* (DVORAK & CRANE, 1981; GRIMWOOD *et. al.*, 1996). Em populações de células CHO (*chinese hamster ovary*) e MDBK (*bovine kidney*), os parasitas aderem em uma proporção três vezes maior em células que estão nas fases G1 e S do ciclo celular do que em relação as que entram na fase G2/M (GRIMWOOD *et. al.*, 1996).

Os polissacarídeos têm sido muito usados como inibidores da interação entre o parasita e o hospedeiro (ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999). Experimentos mostraram um tipo de lectina, envolvida na interação por conter polissacarídeos como heparina, fucoidan e dextran-sulfato, pode facilitar ou bloquear a adesão do parasita na célula hospedeira dependendo da concentração de polissacarídeo usada. Linhagens de célula deficientes na síntese de proteoglicano apresentam uma diminuição na habilidade de ligação ao parasita, outra vez implicando a atividade da lectina no fenômeno da adesão do parasita (BLACK & BOOTHROYD, 2000).

## 1.5 Ciclo lítico

### 1.5.1 Invasão do parasita

Durante a invasão celular (ciclo lítico - figura 1.9), o parasita se ajusta dentro de um vacúolo protetor, não entrando em contato com o citoplasma do hospedeiro, onde por endodiogonia (replicação assexuada) produz  $2n$  novos parasitas no vacúolo chamado de vacúolo parasitóforo (PV) (HOFF & CARRUTHERS, 2002). Quando esses novos parasitas se desenvolvem inteiramente, eles saem desta célula e invadem um novo grupo de células.

As células que serviram como bases para sua replicação morrem e esta necrose celular diretamente ou indiretamente, seguida de resposta inflamatória, conduz a uma patologia observada especialmente no tecido nervoso (alvo) tais como o cérebro. Tanto a invasão e o egresso dos parasitas são eventos rápidos que são cruciais à sobrevivência do *T. gondii*

Esta invasão na célula hospedeira envolve a exocitose sucessiva das organelas, microne-  
mas, roptrias e grânulos densos, sugerindo que essa invasão seja realizada em três etapas suces-  
sivas:

- **Micronemas:** agiriam no reconhecimento e na adesão inicial do parasita aos receptores da superfície adequada da célula hospedeira;
- **Roptrias:** agiriam na invasão propriamente dita, que seria a internalização do parasita dentro do vacúolo parasitóforo recém-formado;
- **Grânulos densos:** estariam envolvidos na remodelação do vacúolo parasitóforo como um compartimento metabolicamente ativo para o crescimento do parasita (NEVES *et. al.*, 2000).

A entrada do *T. gondii* dentro de células não fagocíticas no hospedeiro é um processo ativo que envolve o motor de actina e miosina dentro do parasita e certas proteínas transmembranas. Sendo um processo ativo, é dependente de energia, e pode mover a célula a uma razão que varia de 1 a 10  $\mu\text{m/s}$ , movimento esse considerado rápido (KING, 1998). Os parasitas esporosários (incluindo *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Gregarina* e *Plasmodium*) e certas algas verdes (desmidiaceae, diatomaceae, e *Chlamydomonas*) demonstram a forma de deslizamento (*glidding*) de translocação celular (BLOODGOOD, 1989).



A motilidade do *T. gondii* pode ser observada *in vitro* por microscopia de contraste de fase ou indiretamente por marcação das moléculas de superfície que são depositadas no substrato formando um rastro (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996; RUSSEL & SINDEN, 1981; STEWART & VANDERBERG, 1988). Toda locomoção celular ocorre por movimento da posição de contato entre a superfície celular e o substrato ao longo do corpo do parasita na mesma orientação dos microtúbulos subpeliculares. Devido à forma espiral do citoesqueleto, a motilidade do tipo deslizamento sobre a superfície resulta numa trajetória helicoidal ao redor do eixo longitudinal da célula (RUSSELL & SINDEN, 1981; KING, 1988; STEWART & VANDERBERG, 1988; HAKANSSON *et. al.*, 1999).

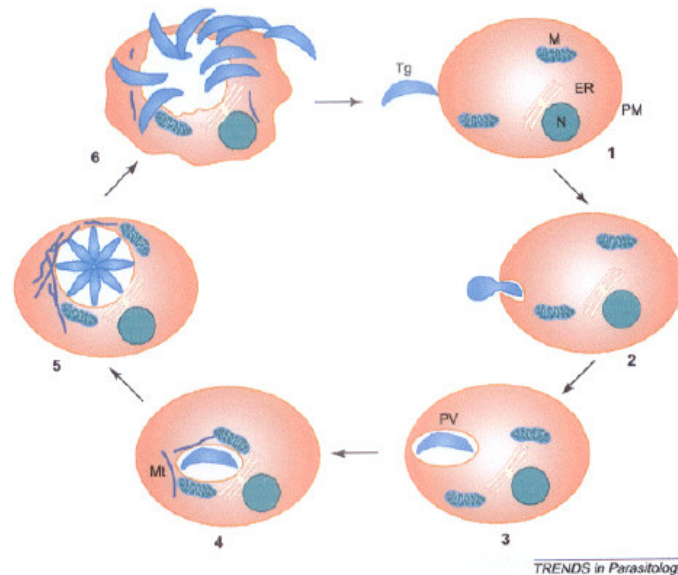


Figura 1.9. Representação do ciclo lítico do *Toxoplasma gondii*.

As etapas principais incluem a invasão (etapas 1 e 2), crescimento intracelular (etapas 3-5) e egresso (etapa 6). Etapa 1, a aderência do parasita à membrana da célula do hospedeiro depende das secreções de compostos presentes nos micronemas. Etapa 2, o parasita penetra ativamente na membrana da célula devido a secreções de compostos agora presentes nas roptrias e dos granules densos enquanto incorpora na célula estabelecendo o vacúolo parasitóforo (etapa 3), derivada primeiramente da membrana plasmática da célula do hospedeiro. Etapa 4, o vacúolo migra para o núcleo, recrutando a mitocôndria, o retículo endoplasmático e se associando a componentes do citoesqueleto. Etapa 5, replicação exponencial do parasita. Etapa 6, egresso mediante a um sinal apropriado, tendo por resultado a lise da célula do hospedeiro. Abreviaturas: (ER) retículo endoplasmático; (M) mitocôndria; (Mt) microtúbulos; (N) núcleo; (Pm) membrana plasmática; (Pv) vacúolo parasitóforo; (Tg) taquizoíto.

Fonte: HOFF & CARRUTHERS, 2002

### 1.5.1.1 Motilidade do parasita

A primeira etapa no processo de invasão ocorre quando o parasita desliza sobre a superfície da célula hospedeira e posiciona sua região anterior, o conóide, em direção à célula alvo, formando uma invaginação na membrana plasmática da célula. Uma estrutura transiente chamada junção móvel é observada, sendo um ponto focal na qual o parasita e da célula hospedeiras são aparentemente ligados um ao outro (AIKAWA *et. al.*, 1977; MICHEL *et. al.*, 1980; NICHOLS & O'CONNOR, 1981; CHIAPPINO, NICHOLS & O'CONNOR, 1984). Após essa etapa, o parasita entra na célula hospedeira, de forma rápida (entre 15 e 30s), mediada pela constrição do corpo do parasita passando para dentro da célula. No evento de invasão durante a fagocitose, realizada por fagócitos profissionais como os macrófagos, o processo é mais lento, ocorrendo entre 2 e 4 minutos, pois a fagocitose é normalmente associada com o rearranjo do citoesqueleto da célula mamífera. Nenhum rearranjo foi visto durante a invasão por *T. gondii* de outros tipos celulares (BLACK & BOOTHROYD, 2000).

A motilidade do parasita na invasão da célula hospedeira foi testada observando-se o papel da citocalasina D, um potente inibidor do fenômeno de deslizamento (*glidding*) do *T. gondii*, a qual interrompeu a infecção de células fagocíticas e não fagocíticas (RYNING & REMINGTON, 1978; SCHWARTZMAN & PFEFFERKORN, 1983). Similarmente, inibidores da atividade da miosina também bloqueavam a motilidade e a invasão, indicando que o motor de actina/miosina é essencial para a penetração na célula.

O envolvimento ativo dos microtúbulos na motilidade foi testado ao se utilizar inibidores que preveniam a polimerização das subunidades de tubulina. Os inibidores griseofulvina, colchicina, sulfato de vinblastina e nocodazole não inibiram o fenômeno de deslizamento, ao afetar a formação dos microtubulos, comprovando que a motilidade não necessita da ativação dinâmica da polimerização e despolimerização da tubulina (RUSSELL & SINDEN, 1981).

A polimerização de actina nos microfilamentos é peça chave na formação e extensão dos pseudópodos durante o movimento amebóide. No *T. gondii*, a actina é encontrada normalmente na forma monomérica; no entanto, agentes químicos que interrompem a polimerização dos microfilamentos, como a jasplaquinolida, paralisam a motilidade e bloqueiam a invasão (POUPLE & TARDIEUX, 1999; RYNING & REMINGTON, 1978; SIBLEY, HAKANSSON & CARRU-

THERS, 1998). Todos esses dados suportam a importância do deslizamento na invasão ativa em células não fagocíticas pelo *T. gondii*.

Uma proteína chamada MIC2 do *T. gondii* pode construir uma ponte entre um ligante extracelular do hospedeiro e o motor actina/miosina para a locomoção celular. Esta proteína contém motivos trombospondina e semelhantes à integrina, mediando a interação com a célula hospedeira. Entretanto, MIC2 é secretado no meio extracelular pelo parasita coincidindo com o processo proteolítico de proteínas da superfície do parasita, a qual é um mecanismo comum de liberação de proteínas adesivas no parasitas apicomplexas (CARRUTHERS *et. al.*, 2000).

Dois modelos de como o *T. gondii* desliza através do substrato foram sugeridos. O primeiro modelo (figura 1.10, A) é chamado movimento linear (KING, 1988). Proteínas transmembrana ligadas ao ligante extracelular se associam com miosinas do lado citoplasmático, as quais se ligam aos microfilamentos de actina localizadas logo abaixo do plasmalema. Os microfilamentos são alinhados de acordo com a orientação dos microtúbulos subpeliculares ligados ao IMC, resultando na locomoção em espiral. No segundo modelo sugerido (figura 1.10, B), o IMC tem uma função mais ativa na motilidade (MORRISSETTE *et. al.*, 1997). Neste modelo, tanto a miosina quanto a actina se encontram em contato direto com os microtúbulos subpeliculares abaixo do IMC. No lugar da miosina, as partículas intramembranas (IMPs) se associam ao IMC ligadas pelo lado citoplasmático com as proteínas transmembrana. As IMPs ligadas às miosinas são conectadas através de redes secundárias de filamentos e se movem ao longo dos microfilamentos associados com os microtúbulos subpeliculares.

### ***1.5.2 Eventos secretórios durante a invasão***

A invasão é concomitante à descarga seqüencial de proteínas de duas organelas secretórias no parasita: primeiramente as micronemas (ACHBAROU *et. al.*, 1991; CARRUTHERS & SIBLEY, 1997; NGO, HOPPE & JOINER, 2000) e depois as roptrias (Figura 1.11) (NICHOLS, CHIAPPINO & O'CONNOR, 1983). Essas organelas secretam seus conteúdos logo após o contato com a célula hospedeira (CARRUTHERS & SIBLEY, 1997). As proteínas secretadas pelos micronemas incluem uma variedade de adesinas que permitem a ligação com os ligantes na superfície da célula hospedeira. As proteínas liberadas pelas roptrias colaboram com a formação do vacúo-

lo parasitóforo (PV) e contribuem também com a formação e as propriedades funcionais da membrana do vacúolo parasitóforo (PVM) (CAREY *et. al.*, 2004).

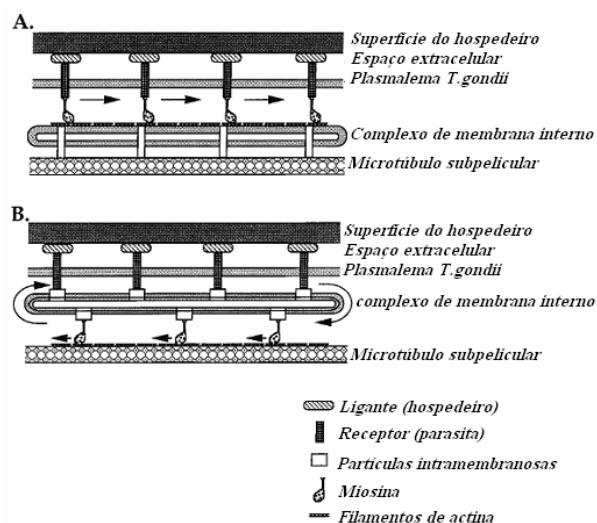


Figura 1.10. Modelos de motilidade no *T. gondii*.

Fonte: Black & Boothroyd, 2000, modificado

Cada parasita tem entre 8 e 16 roptrias, as quais são organelas extremamente ácidas e derivadas de vesículas secretórias do Complexo de Golgi do parasito. Durante a invasão, as roptrias secretam seu conteúdo dentro do PV nascente através de um estreito canal formado no conóide pela fusão da membrana da roptria com a região apical (NICHOLS *et. al.*, 1983; PROCHET-HENNERE & NICOLAS, 1983). Das nove proteínas identificadas na organela chamada roptrias (ROP), apenas ROP1 e ROP2 foram estudadas em maiores detalhes. Estudos utilizando *knockout* gênico revelaram que ROP1 não é essencial para a invasão ou sobrevivência intracelular (KIM *et. al.*, 1993). Embora sua função ainda permaneça desconhecida, ROP1 é utilizada como um modelo de estudos de tráfico e processamento de proteínas (BRADLEY & BOOTHROYD, 1999; BRADLEY & BOOTHROYD, 2001; BRADLEY *et. al.*, 2002). Estudos recentes demonstram que a proteína ROP2 medeia a associação entre o PV e mitocôndrias da célula hospedeira (SINAI & JOINER, 2001). Estudos utilizando a técnica de RNA anti-sense sugere que ROP2 é importante não somente para a interação entre a PVM e organelas do hospedeiro, mas também para a biogênese das roptrias, invasão do parasita e replicação intracelular (NAKAAR *et. al.*, 2003).

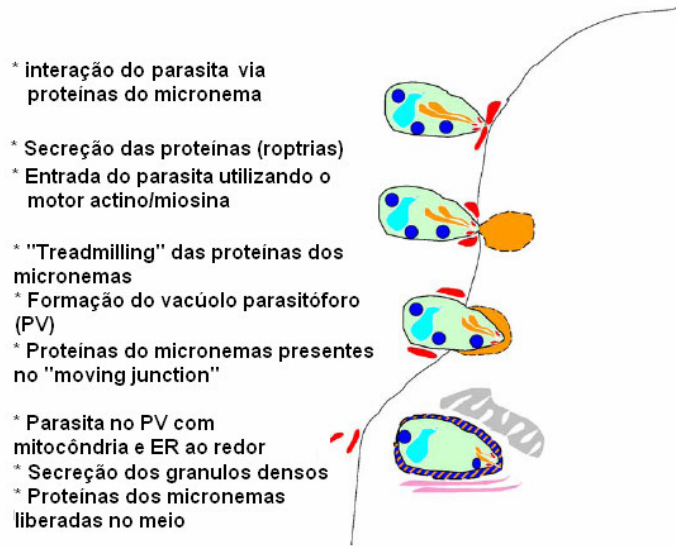


Figura 1.11. Etapas necessárias para a invasão celular do *T. gondii*.

A invasão é um processo rápido acompanhado por secreção seqüencial das proteínas dos micronemas (vermelho), roptrias (laranja) e grânulos densos (azul).

Fonte: KIM, 2004, modificado

### 1.5.3 Formação e modificação do vacúolo parasitóforo pelo parasita

O vacúolo gerado durante a invasão do *T. gondii* é usualmente não acidificado (SIBLEY *et. al.*, 1985). Essa diferença distinguiu dois tipos de vacúolos que podem ser observados em células fagocíticas: o fagossoma e o PV. Quando parasitas opsonizados são fagocitados, esse fagossoma é rapidamente acidificado e segue a via endocítica, resultando na digestão do parasita internalizado. Prevenindo a acidificação e o processo endocítico, o PV formado pela invasão do parasita exclui ou elimina rapidamente as bombas de prótons e proteínas da superfície que são usadas na fusão vesicular (por exemplo:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, CD44,  $\beta_1$ - integrina) . A ausência de algumas proteínas da família SNARE na membrana do vacúolo, as quais estão envolvidas na fusão vesicular, provavelmente explica a falha do vacúolo formado juntamente com o parasita de se fundir com algum compartimento na cascata endocítica e/ou acidificação (COPPENS & JOINER, 2001).

Após o vacúolo ser formado, o terceiro grupo de organelas, chamada grânulos densos, descarrega seu conteúdo (CARRUTHERS & SIBLEY, 1997). Vesículas multilamelares, similares às secretadas pelas roptrias durante a invasão, são liberadas de uma invaginação especializada

na região posterior, aproximadamente entre 10 e 20 minutos pós-invasão (SIBLEY *et. al.*, 1995). Esses longos túbulos parecem responsáveis pela formação de uma rede túbulo-vesicular que se estende na membrana e chega ao lúmen do vacúolo (SIBLEY & KRAHENBUHL, 1986). A função desta rede não é bem clara, mas parece aumentar de forma drástica a superfície do PV e são associadas com quatro proteínas dos grânulos densos, denominadas GRA1, GRA2, GRA4 e GRA6. Três outras proteínas dos grânulos densos, denominadas GRA3, GRA5 e GRA8, estão localizadas na membrana vacuolar. A membrana do PV é uma estrutura porosa com tamanho limite de exclusão de aproximadamente 1,3 kDa. Foi proposto que GRA3 se insere dentro da PVM podendo funcionar como um complexo formador de poro.

#### ***1.5.4 Replicação do parasita***

O parasita se replica dentro da célula através de um processo chamado endodiogenia. Isso foi definido morfológicamente por microscopia eletrônica, mas os sinais celulares e a maquinaria responsável pela divisão são relativamente desconhecidos, excetuando-se as propriedades de funcionamento dos microtúbulos do parasita e dos filamentos de actina.

A endodiogenia é marcada pelo aparecimento de duas membranas subpelículas que começam a serem formadas no meio da célula (figura 1.12). Dentro da célula mãe estas estruturas membranosas começam a definir as células filhas aparecendo pontos de um conóide rudimentar e um centro organizado de microtúbulos. Um IMC se estende por essa região, e a célula mãe se torna mais esférica, com as organelas apicais, as roptrias e micronemas, sendo formadas em dois pólos anteriores de crescimento. A clivagem se inicia no pólo anterior e se estende até o final do corpo da célula. Cada célula constitui um citoplasma maduro e todos os constituintes são divididos entre as duas progênes. Eventualmente a IMC materna desaparece e o plasmalema original é usado para envolver as duas células novas. A clivagem da célula é iniciada no sentido antero-posterior. O resultado da ligação na porção final entre as células durante a divisão é chamada de roseta (Figura 1.9, etapa 5).

### **1.5.5 Egresso**

Os organismos têm variados mecanismos para o egresso e transmissão à célula vizinha. O egresso é um evento rápido que resulta na lise da célula hospedeira, com uma movimentação alta do parasita. Por vídeo-microscopia, todos os parasitas intracelulares dentro da uma simples célula hospedeira sincronicamente passam através da PVM, do citoplasma do hospedeiro e finalmente à membrana plasmática do hospedeiro. O parasita atravessa cada membrana através da constrição do corpo do parasita, parecendo o anel de junção observado durante a invasão. Embora ainda não tenha sido demonstrado qualquer evento secretório associado ao egresso do *T. gondii*, merozoítas de *Plasmodium* secretam proteínas de suas roptrias nos eventos iniciais ao egresso em eritrócitos (CREWETHER *et. al.*, 1990). Sendo as proteínas dos micronemas de fato necessárias para a motilidade, por mediar uma ponte entre o exterior e o motor de actina/miosina, postula-se que estas organelas induzam a exocitose durante o egresso. Uma vez fora da célula lisada, o parasita rapidamente pode invadir as células vizinhas e parando após ele ser envolvido pelo novo vacúolo, assim completando o seu ciclo lítico (BLACK & BOOTHROYD, 2000). Ao analisar este processo muitas dúvidas surgiram a respeito deste ciclo lítico. Diversos estudos recentes apóiam a noção que o parasita usa o mesmo ou os mecanismos moleculares similares para a invasão e o egresso dos parasitas (HOFF & CARRUTHERS, 2002).

### **1.5.6 Sinalizadores da invasão e o egresso**

O  $Ca^{++}$  foi demonstrado como importante na ativação do processo de egresso (ENDO *et. al.*, 1982; SCHWAB *et. al.*, 1994). A relação entre o cálcio e o egresso foi primeiramente demonstrada usando o ionóforo de cálcio A23187 em macrófagos murinos infectados (ENDO *et. al.*, 1982). Esta droga aumenta a permeabilidade da difusão passiva de cátions divalentes, como o cálcio, aumentando o gradiente de concentração. Foi observado que parasitas intracelulares expostos a esta droga podiam deixar a célula hospedeira parecido com o egresso natural (ENDO *et. al.*, 1982).

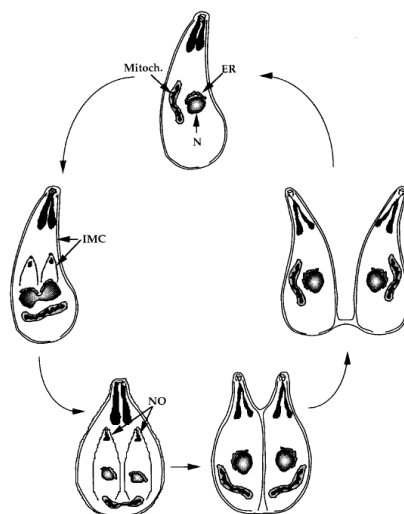


Figura 1.12. Ilustração do fenômeno de divisão do *Toxoplasma gondii* por endodiogenia.

Dois IMCs começam a se desenvolver no meio da célula e se estendem até núcleo (N), retículo endoplasmático (ER) e a mitocôndria (Mitoch.) onde essas organelas se dirigem para dentro desta membrana. Desenvolvimento das organelas apicais nascentes (NO) no pólo anterior das células filhas. A clivagem se inicia no pólo anterior e se estende até o final do corpo da célula, onde pode haver uma conexão residual do corpo entre as células filhas.

(Fonte: Black & Boothroyd, 2000)

A invasão é criticamente dependente da mobilização de cálcio no meio extracelular e para o parasita (BECKERS *et. al.*, 1994). No parasita o complexo cálcio-calmodulina está concentrado na região apical, antes da invasão, regulando as funções necessárias no processo de invasão como a motilidade, secreção e atividades enzimáticas do parasita das fosfolipases A2 (PLA<sub>2</sub>) dependentes de cálcio, que são detectadas principalmente nas roptrias (BONHOMME *et. al.*, 1999). Antagonistas da calmodulina reduzem a invasão prevenindo a estimulação de certas enzimas calmodulina cálcio-dependente (TANAKA *et. al.*, 1983). Esta enzima é ativada na presença de cálcio pela MAP-quinase do parasita. Os produtos da ação da fosfolipase A2, como ácido araquidônico, são gerados a partir dos fosfolipídeos da membrana do hospedeiro, podendo causar a lise local, por afetarem a fluidez da membrana ou pela liberação dos estoques de cálcio intracelular (BONHOMME *et. al.*, 1999; LIN, *et. al.*, 1993). O tratamento das células com PLA<sub>2</sub> exógeno causa distúrbios na membrana da célula aumentando a frequência de invasão por *T. gondii*, indicando o envolvimento desta enzima na remodelação da membrana e formação de novos vacúolos (BONHOMME *et. al.*, 1999; LIN, *et. al.*, 1993).

O aumento das concentrações de cálcio citosólico na célula hospedeira foram estudados pelo tratamento com ditiotreitól (DTT). Células infectadas tratadas com esse agente redutor



mostraram um aumento de 15 a 50% de cálcio no citoplasma imediatamente após a ativação da motilidade do parasita e o egresso (STOMMEL *et. al.*, 1997). Esta peculiar resposta do DTT parece ser dependente do parasita e da célula hospedeira, já que o DTT não aumenta a concentração de cálcio citoplasmático em células não infectadas e a motilidade do parasita em meio extracelular (STOMMEL *et. al.*, 1997).

## **1.6 Alterações na célula hospedeira**

O PV é rodeado por uma rede de filamentos intermediários na célula hospedeira (HALONEN & WEIDNER, 1994). Como o parasita sofre sucessivas divisões dentro célula, o vacúolo se alarga induzindo mudanças na distribuição destes filamentos da célula hospedeira. O citoesqueleto de vimentina é normalmente distribuído uniformemente por todas as partes da célula não infectada, havendo uma redistribuição intensa ao redor do PV em células infectadas. Isto sugere que rede de filamentos intermediários do hospedeiro serve como compartimento seguro e de condução de nutrientes e metabólitos dentro das proximidades dos parasitas.

Quando a PVM nascente está sendo formada, associações íntimas ocorrem entre a PVM e mitocôndrias e retículo endoplasmático (maquinaria de biosíntese de lipídeos) da célula hospedeira. Essa associação pode contribuir para o estabelecimento ou manter o estado não fusogênico do vacúolo (DE MELO *et. al.*, 1992; LINDSAY *et. al.*, 1993; SINAI *et. al.*, 1997). A análise ultraestrutural demonstrou que células do músculo esquelético continham estruturas ao redor do PV semelhantes a microtúbulos, sugerindo que essa estrutura pode agir também como barreira para a fusão fagolisossomal (ANDRADE *et. al.*, 2001). A proteína ROP2, que é secretada durante a invasão pelo parasita, está ligada à PVM e age como mediador da associação da PVM com as mitocôndrias e retículos do hospedeiro. O domínio amino-terminal desta proteína está exposta no lado citoplasmático, assim ajudando nestas associações organelares com a PVM (SINAI & JOINER, 2001). Entretanto, em recentes estudos analisando a distribuição destas organelas em células infectadas, usando microscopia confocal por escaneamento a laser, foi demonstrado que mitocôndrias de muitas células infectadas não se localizavam ao redor do PV (SINAI & JOINER, 2001).

### **1.6.1 Modificações fisiológicas na célula hospedeira**

A atividade das MAP-quinases está estimulada em células que são infectadas com *T. gondii* (GOMEZ-MARIN *et. al.*, 1998). Estes eventos podem ser comparados ao que ocorre na infecção de linfócitos bovinos por *Theileria parva*. Neste processo, a proteína quinase C (PKC) do parasita e a via de transdução de sinal do hospedeiro são necessários para a entrada do esporozoítio (SHAW, 1995). Na infecção por *T. gondii* o decréscimo da atividade da MAP-quinase nas células infectadas podem ser causadas pelo interferon- $\gamma$  como resposta protetiva.

A concentração intracelular de cálcio livre na célula hospedeira também varia nas células infectadas (BOUCHOT *et. al.*, 1999). O gradiente positivo de concentração de cálcio do citoplasma da célula hospedeira para o PV é observado em 24 horas após a infecção. Quando o parasita entra na célula, ele é capaz de ativar as bombas de cálcio do hospedeiro. Através dos poros na membrana do vacúolo parasitóforo o cálcio pode, por difusão, passar através da membrana devido à presença de produtos secretados do parasita dentro do vacúolo, capazes de se ligar ao cálcio (CESBRON-DELAUW *et. al.*, 1989). Um candidato para essa atividade é a proteína GRA1 que está associada à rede túbulo-vesicular do PV, a qual tem alta afinidade por cálcio. Como consequência da infecção, após 48 horas, quando os parasitas estão replicando e formando rosetas, a concentração de cálcio no citoplasma da célula hospedeira é baixa em relação às células não infectadas. O aumento da concentração de cálcio no hospedeiro e o disparo do parasita parecem ser um sinal coordenado, sendo que o aumento da concentração de cálcio no PV pode ser sinal para desencadear o egresso do parasita. Exposição do parasita ao ditiotreitol pode induzir esse egresso pela ativação das NTPases do parasita, sugerindo o envolvimento dessa enzima no influxo de cálcio (SILVERMAN *et. al.*, 1998; STOMMEL *et. al.*, 1997). Assim, a regulação de cálcio na célula hospedeira e no compartimento vacuolar parecem ser correlacionados com o crescimento e o disparo do parasita.

### **1.6.2 Retirada dos nutrientes do hospedeiro**

Sendo o *T.gondii* um parasita intracelular obrigatório é clara a idéia de que o parasita retira compostos essenciais de nutrientes contidos no citoplasma da célula hospedeira. A PVM presumidamente tem duas funções: proteger o parasita de substâncias potencialmente prejudi-

ciais e facilitar o acesso através de processos ativos ou passivos concentrando esse compostos dentro do vacúolo. A restrição do tamanho dos poros desta membrana previne o acesso de proteínas do hospedeiro ao vacúolo, mas segue por difusão pequenas moléculas independentemente de suas propriedade físico-químicas. Como os canais são bidirecionais, o poro também previne a acumulação de metabólitos dispensados pelo parasita dentro do PV, permitindo que o parasita permaneça no PV por períodos indefinidos (SCHWAB *et. al.*, 1994).

#### **1.6.2.1 Nucleosídeos e transporte**

O parasita recupera adenina, nucleosídeos ou nucleotídeos para a síntese macromolecular porque não é capaz de converter guanina para a base adenina. A adenosina quinase (AK) do parasita é extremamente ativa e pode rapidamente converter adenosina em adenina. O modelo proposto de retirada de adenosina é o seguinte: o ATP da célula passa por difusão para dentro do vacúolo pelo poro da membrana e ao entrar no lúmen do vacúolo ele é sequencialmente hidrolisada para adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) pelas NTPases intravacuolares. O AMP é clivado em adenosina pela 5'-nucleotidase e é transportado para dentro do parasita (BERMUDES *et. al.*, 1994; ASAI *et. al.*, 1995).

O parasita também retira hipoxantina, adenina, inosina e guanina, mas não pode usar a adenina como purina devido à ausência da fosforibosiltransferase (SCHWAB *et. al.*, 1995).

Embora o parasita não seja deficiente na síntese de pirimidinas, ele é capaz de acumular estes compostos eficientemente, a partir do citoplasma do hospedeiro, indicando a presença específica deste mecanismo (ASAI *et. al.*, 1983).

#### **1.6.2.2 Lipídeos e transporte**

O mecanismo pelo qual o *Toxoplasma gondii* retira lipídeos derivados da célula hospedeira é pouco conhecido. Esses estudos são extremamente desafiadores devido à inabilidade em se separar efetivamente as atividades derivadas do parasita e funções da célula hospedeira. Pouco se sabe sobre a dinâmica do colesterol e o transporte de fosfolipídeos entre membranas da célula de mamíferos. Proteínas são constitutivamente liberadas dentro do PV para o crescimento dos parasitas sendo importante na aquisição necessária de lipídeos da célula hospedeira (COPPENS & JOINER, 2001).

O *T. gondii* desvia colesterol LDL-derivado dos lisossomos do hospedeiro. O tráfico de colesterol dos lisossomos para o PV requer o funcionamento de proteínas Niemann-Pick Tipo C do hospedeiro conhecidas como mediadoras da retirada de colesterol através da membrana endo-lisossomal (independente do Golgi e retículo). Nas células de mamíferos, o colesterol é transportado pelos lisossomos para a superfície celular e depois redistribuídos para vários compartimentos celulares por mecanismos não definidos. O PV não é excluído do caminho do colesterol do hospedeiro. O colesterol se movimenta para o PV necessitando de temperatura permissiva para o transporte vesicular, energia metabólica e microtúbulos funcionais. Sítios de proteínas ligantes ao colesterol na membrana do vacúolo parasitóforo e na membrana plasmática promovem a distribuição do colesterol para o parasita (COPPENS, 2006).

Em fibroblastos infectados com *T. gondii*, receptores de LDL estão aumentados (3x) e a enzima HMG-CoA redutase, chave para a biosíntese do colesterol, também está aumentada (4x) (BLADER *et. al.*, 2001). Essas proteínas contribuem para o aumento do nível de colesterol, demonstrando a modulação do metabolismo do colesterol do hospedeiro como consequência da interação do parasita nas vias regulatórias ou incapacidade da célula funcionar normalmente no estresse pelo parasita (COPPENS, 2006).

Nos mamíferos os fosfolipídeos podem se mover através das membranas por rotas que são independentes do tráfico de vesículas sendo transportadas por proteínas de membrana. Diversas evidências apóiam a idéia de que o sistema de transporte de fosfolipídeos ocorrer através do contato entre a membrana doadora e a membrana receptora que é incapaz de sintetizar os lipídeos necessários. Este transporte inter-organela ocorre entre o retículo e a mitocôndria ou o Golgi envolvendo regiões especiais do retículo conhecidos como MAM (membrana de associação à mitocôndria). Interessante observar que a PVM rapidamente se associa fisicamente com o retículo e a mitocôndria e essa relação entre essas organelas com a PVM pode representar uma região privilegiada de trocas de lipídeos entre o hospedeiro e o PV. A transferência direta de fosfolipídeos pode também ocorrer da mitocôndria do hospedeiro para regiões na PVM que podem ser análogas à MAM, pois, conforme visto em outros trabalhos, o bloqueio de proteínas que mediam a retenção organelar na PVM resultou na falha de recrutamento de mitocôndria no PV e a aquisição de lipídeos do hospedeiro (NAKAAR *et. al.*, 2003).

### 1.6.2.3 Aminoácidos e Transporte

Muito pouco se conhece das necessidades auxotróficas do *T. gondii* com relação a aminoácidos. Entretanto, um aminoácido auxotrófico bem conhecido é o triptofano, que tem sido usado como base para análises de seleção genética. O parasita provavelmente requer outros aminoácidos essenciais, bem como fonte de carbono, como glicose, para o crescimento, visto que existem transportadores para essas pequenas moléculas na membrana plasmática do parasita (COPPENS & JOINER, 2001).

## 1.7 Encistamento e permanência na célula mamífera

Embora os taquizoítos e bradizoítos tenham uma estrutura similar, as alterações produzidas no fenótipo da célula hospedeira são diferentes (DUBEY *et. al.*, 1998). Tanto os taquizoítos quanto os bradizoítos são intracelulares e se dividem por fissão binária (endodiogenia). Os taquizoítos se dividem rapidamente e sincronicamente, formando rosetas e lisando as células em cerca de 48 horas, os bradizoítos crescem lentamente e exibem um crescimento não sincronizado formando cistos no tecido infectado. O encistamento proporciona ao parasita proteção e é associado com um metabolismo lento e mudanças morfológicas reduzindo a replicação dos bradizoítos. A parede do cisto é derivada da PVM modificada, composta por componentes da célula hospedeira e do parasita (DUBEY, *et. al.*, 1998). No cérebro, os filamentos das glias estão presentes na parede dos cistos e arrançados ao redor numa camada concêntrica medindo cerca de 5 a 10 µm de espessura. A camada de filamentos da glia impede o contato das mitocôndrias e retículo com a superfície dos cistos. O tamanho do cisto maduro no tecido é variável, dependendo da idade do cisto, do tipo de célula parasitada e cepas do *T. gondii*. A média é de 50 a 70 µm e cada cisto contém cerca de 1.000 a 2.000 formas crescentes de bradizoítos. Os bradizoítos desenvolvem cistos dentro de vários tipos de tecidos, sendo mais comum em tecido neural (neurônios e células da glia) e tecido muscular (coração, músculo esquelético). Entretanto ainda não é clara qual é a preferência ou predominância de células nas quais o cisto é formado e se a célula hospedeira influencia a formação deste cisto. Os cistos são aceitos como uma estrutura que não é estática rompendo células e re-invadindo outras. Quando o tecido cístico se rompe é estimulado fortemente a resposta inflamatória resultando na formação de nódulo glial no cérebro de hospedeiros cronicamente infectados (COPPENS & JOINER, 2001).

## 1.8 Genômica funcional

O fenótipo de uma determinada célula num determinado estágio de desenvolvimento ou que sofre algum tipo de interação com o meio no qual ela se encontra acaba resultando da ação integrada dos produtos gênicos que estão sendo expressos e transformados em proteínas. Deste modo, esse processo de interação pode provocar muitas alterações metabólicas e morfológicas envolvendo a regulação de redes gênicas nesta célula. Com isso, novos recursos tecnológicos foram desenvolvidos e levaram a criação da área de pós-genômica, destacando-se nela a genômica funcional. Entre estes recursos estão aqueles que permitem a análise em grande escala de transcritos – DD ou *differential display* (LIANG & PARDEE, 1992), RDE ou *representation of differential expression* (KRIEGER & GOLDENBERG, 1998) – e de seus produtos – eletroforese bidimensional, microarranjos de DNAs, espectrometria de massa MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*), eletroforese diferencial em gel (DIGER), *multiplex proteome* (MP) e rotulação de proteínas com reagentes ICAT (*isotope-code affinity tagging*) (PANDLEY & MANN, 2000).

Tais recursos procuram fazer a correlação dos genomas à sua função biológica pelo estudo das moléculas, transcritos ou proteínas, que estes genomas estão expressando.

Na pós-genômica, a formulação de hipóteses é, *a priori*, mais geral, pois não é possível formular hipóteses com base no desconhecido. Há apenas uma pergunta a ser respondida: Quais genes estão expressos em uma dada situação? A resposta é obtida através da avaliação do próprio transcritoma ou proteoma. A interpretação desta resposta é a tentativa de reconstituição do fenômeno biológico em si, o que pode vir a ser um grande desafio, repleto de hipóteses a serem testadas (MIR, 2000; VIDAL, 2001). Investigar porque ou como um determinado gene está sendo expresso, em uma determinada situação, requer conhecer não apenas a estrutura de seus produtos, transcritos e proteínas, como também a sua interação com os produtos de outros genes.

O desenvolvimento da técnica de microarranjos possibilitou conjugar dados sobre a expressão de genomas inteiros, em diferentes condições biológicas (SCHENA *et. al.* 1995; BROWN & BOTSTEIN, 1999; DUGGAN *et. al.*, 1999; LIPSHUTZ *et. al.*, 1999). Uma das principais aplicações desta nova metodologia é a avaliação comparativa da expressão de milhares de genes (LOCKHART & WINZELER, 2000). Assim, as alterações metabólicas e morfológicas provocadas

por diferentes condições ambientais têm sido investigadas com êxito nos mais variados modelos.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, a reprogramação da expressão genômica foi avaliada frente a diferentes condições de temperatura, oxidação, nutrientes, pH e osmolaridade. Os resultados mostraram que as respostas a estas variações ambientais envolvem mais da metade do genoma desta espécie (CAUSTON *et. al.*, 2001). Ainda em *S. cerevisiae*, o perfil da expressão genômica ao longo da passagem da fermentação para a respiração foi avaliado pela análise em microarranjos. Cerca de 2000 genes foram reconhecidos como diferencialmente expressos. Destes, 400 não apresentavam qualquer similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados. Por outro lado, foi possível observar que muitos genes de função conhecida e associados a este fenômeno apresentaram perfis de expressão compatíveis (DeRISI *et. al.*, 1997)

Resultados como estes podem ser utilizados na construção de grupos hierárquicos de genes que compartilham padrões de expressão (EISEN *et. al.*, 1998). Cada um destes grupos é constituído de genes que apresentam uma sincronia temporal de expressão e que, portanto, devem ser ativados a partir dos mesmos estímulos. É provável que eles desempenhem funções semelhantes ou interdependentes, embora não seja necessário. A correlação entre os genes de um mesmo grupo e determinadas vias metabólicas ou condições biológicas é uma forma de interpretar suas funções. Quando isto não é possível, a melhor alternativa é escolher alguns destes genes como alvos para intensa investigação de sua estrutura e função.

Como são experimentos realizados em larga escala, as análises em microarranjos de DNA são dispendiosos em equipamentos, material de consumo e tempo. O planejamento é, portanto, fundamental para que os resultados obtidos sejam informativos e compatíveis com os recursos empregados. Da mesma forma, a escolha dos métodos para análise das imagens e tratamento dos dados é fundamental para o êxito deste tipo de análise (BASSETT *et. al.*, 1999; YANG & SPEED, 2002; MORRISON & ELLIS, 2003; FORSTER *et. al.*, 2003).

Os resultados obtidos pelo microarranjo precisam ser organizados, disponibilizados e interpretados. Igualmente precisam ser correlacionados aos dados gerados pelo seqüenciamento dos genomas e por outras metodologias da genômica funcional. Para tanto, a bioinformática tem desenvolvido inúmeras ferramentas (EISENBERG *et. al.*, 2000; ISOKPEHI & HIDE, 2003). Algumas plataformas já estão disponíveis para oferecer informações genômicas integradas sobre or-

ganismos em estudo, por exemplo, para *Toxoplasma gondii* (KISSINGER *et. al.*, 2003) e para *Trypanosoma cruzi* (LUCHTAN *et. al.*, 2004). A idéia de um atlas biológico contendo mapas funcionais foi utilizada para ilustrar a necessidade de integração de todos os dados disponíveis para a interpretação de fenômenos complexos e para a formulação de hipóteses ricas em sentido biológico (VIDAL, 2001).

A genômica funcional não pode ser entendida como um ponto final, mas como meio de estudar a expressão de genomas inteiros e de selecionar intensivamente novos genes a serem caracterizados. Ela exige uma forma de pesquisar diferente que seja receptiva à complexidade dos fenômenos biológicos e aos recursos de bioinformática que facilitam a organização e interpretação das informações obtidas. A genômica funcional é, portanto, uma forma ímpar de investigação de fenômenos biológicos complexos dos parasitas e de seus hospedeiros, tais como, o ciclo de vida do parasita, a coevolução parasita-hospedeiro e a resistência do parasita a múltiplas drogas, associados às dificuldades do desenvolvimento de sistemas eficientes de controle e de tratamento das doenças parasitárias (PANDA *et. al.*, 2003).

Uns dos poucos trabalhos voltados à análise em larga escala de expressão gênica da célula hospedeira diante a infecção do *T. gondii* foi publicado em 2001 por BLADER *et. al.*. Neste trabalho foi utilizado um microarranjo, que consistia de sondas para aproximadamente 22.000 genes humanos, no qual o mRNA de fibroblasto infectados com parasitos da cepa PDS, derivada da ME49, do Tipo II, foi comparado com mRNA de fibroblastos não infectos. Nesse trabalho foi demonstrado um aumento significativo das enzimas que estão presentes nas vias da glicólise e da síntese de esqualeno, além de genes relacionados à resposta imune que já se apresentavam alterados após 2 horas de infecção.

Em outro aspecto, na tentativa de estudar os caminhos regulatórios e controle da diferenciação dos bradizoítos, outro trabalho foi publicado em 2002 por CLEARY *et. al.* Para ampliar o conhecimento de grupos de genes que regulam o desenvolvimento e identificar padrões da expressão gênica foi gerado um microarranjo de cDNA de *T. gondii*, contendo aproximadamente 4400 cDNAs, representando no mínimo 600 genes, para estudar as mudanças ao nível dos transcritos durante a diferenciação dos taquizoítos para bradizoítos. Este estudo revelou mudanças no nível de enzimas metabólicas induzidas no estágio bradizoíta como a metionina aminopeptidase (MAP) que regula a biosíntese de proteínas, uma oligopeptidase que regula os caminhos



metabólicos específicos do bradizoíta e uma proteína homóloga da classe II de aminotransferases que está envolvida no metabolismo de aminoácidos e síntese de esfingolipídeos. Proteínas de organelas secretórias também foram vistas com expressão diminuída em bradizoítos.

Outro trabalho publicado em 2003 por CHAUSSABEL *et al* avaliou a expressão dos genes em células dendríticas e macrófagos infectados por diversos parasitas: *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Brugia malayi*, focando mais nas diferenças de resposta a esses parasitas.

Com base no exposto acima, fica claro que existem muito poucos trabalhos avaliando a interação de *T. gondii* com a célula hospedeira utilizando microarranjos de DNA.

### **1.8.1 Definição de microarranjo**

Na sua forma mais geral, um arranjo de DNA é usualmente um substrato (membrana de náilon ou nitrocelulose, vidro ou plástico) sobre o qual são depositados diversos DNAs fita simples distintos com seqüência diferentes. Usualmente, esse DNA é colocado de forma a criar estruturas localizadas que são arranjadas em um padrão regular, semelhante a uma grade. Geralmente, é dado o nome de sonda ao material que é depositado na superfície do substrato. Se a quantidade de sonda distinta é grande e é utilizado sistemas de robótica, as quais permitem a criação de uma densidade muito alta de sondas em uma região muito pequena do substrato, dá-se o nome ao arranjo de DNA resultante de microarranjo de DNA.

O material a ser colocado no microarranjo pode ser de diferentes tipos, de acordo com o propósito do mesmo. Atualmente, os três tipos mais comumente encontrados de microarranjo são os que contêm como sonda produtos de PCR dupla fita, oligonucleotídeos de fita simples denominado longos (entre 45 e 70 mer) e oligonucleotídeos fita simples denominados curtos (geralmente menores que 30 mer). Essas sondas geralmente são complementares à regiões do genoma que codificam proteínas e, portanto, os microarranjos são principalmente focados para a avaliação do transcriptoma codificador de proteínas, embora qualquer tipo de avaliação por hibridação de ácidos nucléicos possa ser implementado.

Existem duas formas principais de manufatura dos microarranjos: através da deposição mecânica ou pela síntese *in situ* das mesmas. Após a fabricação do microarranjo, esse deve ser colocado em contato com as amostras de mRNAs para as quais se deseja conhecer os perfis do

transcriptoma. Até o presente momento, a técnica de microarranjo não apresenta a capacidade quantitativa exigida usualmente e, portanto, é normalmente utilizada para se fazer comparações relativas de perfis de transcrição entre duas ou mais amostras.

O microarranjo é colocado em contato com uma solução contendo a população de mRNA que desejamos estudar, a qual é denominada normalmente de alvo, e essa preparação é deixada sobre controle rigoroso de temperatura para que o pareamento das regiões complementares na sonda e no alvo, que estão ambos em fita simples, possa ocorrer, o fenômeno denominado hibridação. Após ocorrer a hibridação, as moléculas do alvo que não estão pareadas ou que apresentem pareamento fraco são retiradas através de lavagens sucessivas, que não afetam os alvos corretamente pareados com a sonda. Finalmente, a ocorrência da hibridação é possível de ser quantificada, pois as moléculas da população alvo foram marcadas com a adição de agentes fluorescentes ou radioativos, os quais podem ser captados por dispositivos especializados.

#### 1.8.1.1 Conceitos

Alguns conceitos essenciais para uma melhor compreensão da técnica de microarranjo são descritos abaixo:

**Sonda:** material presente na superfície do microarranjo, geralmente DNA, que deve estar em fita simples, e que pode ser oriundo de síntese *in situ* (oligonucleotídeos curtos) ou depositado mecanicamente por um dispositivo robótico (oligonucleotídeo curtos ou longos, produtos de PCR).

**Alvo:** material que é colocado em contato com o microarranjo e que constitui a amostra cujo transcriptoma desejamos avaliar. Normalmente, os RNAs presentes na amostra inicial são transformados em cDNA através do uso da enzima transcriptase reversa. O cDNA resultante dessa reação é marcado com fluoróforos.

**Arranjo:** substrato que contém as sondas. Em microarranjos, esse substrato é rígido, usualmente vidro tratado, e as sondas são dispostas de forma precisa e em alta densidade por um dispositivo robótico ou pela síntese *in situ*.

**Marcação:** processo no qual é adicionada às moléculas presentes no alvo substâncias que permitem avaliar a ocorrência da hibridação.

**Fluoróforo:** substância que, quando excitada por um feixe de luz em determinado comprimento de onda, emite radiação em uma faixa de intensidade visível. É a substância mais comumente utilizada para a marcação dos alvos a serem hibridados.

**Escaneamento:** processo no qual a lâmina é submetida a um feixe de raio laser em um comprimento de onda específico e a radiação emitida pela excitação é captada por um dispositivo analógico, geralmente uma câmera CCD, e transformada em sinal digital, o qual é armazenado em uma imagem digitalizada de 16-bit.

**Ruído:** os experimentos de microarranjos são extremamente influenciado pelo ruído, que representa uma transformação da relação do nível do mRNA no alvo versus sinal obtido pelo escaneamento do microarranjo. As causas do ruído são diversas e estão presentes de maneira desigual em diferentes experimentos distintos de microarranjo. Geralmente, esse ruído é dividido em técnico ou biológico, embora somente o primeiro seja realmente uma deturpação da relação linear entre a concentração do mRNA do alvo e o sinal obtido. O segundo representa a complexidade dos sistemas biológicos, a redundância do transcriptoma e a incompreensão atual dos fenômenos moleculares estudados.

**Réplica técnica:** toda a forma de controle do ruído técnico que se baseie em fazer repetições de algum procedimento é denominada réplica técnica.

**Réplica biológica:** as repetições de um experimento visando verificar a complexidade e os fenômenos do sistema biológico.

### 1.8.1.2 Fabricação de microarranjos

Dois procedimentos principais são utilizados na fabricação de microarranjos: deposição de moléculas de DNA e síntese *in situ*. O primeiro tipo de fabricação pode depositar dois tipos de sondas: produtos da amplificação por PCR e oligonucleotídeos sintetizados. A fabricação *in situ* pode ser dividida em fotolitografia, impressão por jato de tinta e síntese eletroquímica.

- **Síntese por deposição:** nessa técnica, o DNA a ser aplicado é preparado fora do microarranjo. Um aparelho robótico contendo pinos pequenos e confeccionados com alta precisão os mergulha em solução contendo a sonda a ser depositada e então toca os pinos na superfície do substrato. Pequenas quantidades de DNA são depositadas no arranjo na forma de *spots* (elemento morfológico circular criado pela sonda). Desta maneira é possível usar pequenas seqüências, genes inteiros ou produtos de PCR de tamanho arbitrário.

- **Síntese *in situ*:** durante a fabricação dos microarranjos baseados na síntese *in situ*, as sondas são fotoquimicamente sintetizadas no substrato. Não utiliza etapas de clonagens, amplificação por PCR ou deposição mecânica. A eliminação desses passos, que introduzem ruído ao sistema, consiste em uma vantagem desse procedimento. A seleção das sondas é feita baseada somente na informação da seqüência gênica, o que permite que cada sonda no microarranjo seja bem conhecida, o que pode não acontecer nos microarranjos de produtos de PCR. Adicionalmente, essa técnica pode distinguir e monitorar quantitativamente genes muito próximos em similaridade, porque é possível evitar seqüências idênticas entre membros de famílias gênicas, embora tal fato possa também ser feito pelo uso de oligonucleotídeos longos, depositados na superfície do microarranjo. A síntese *in situ* é representada por três diferentes tipos de procedimento.

- **Fotolitografia:** essa tecnologia é similar à utilizada para a criação de sistemas e circuitos integrados presentes nos computadores modernos. Esse processo de fabricação utiliza uma máscara específica para cada base. Se uma sonda deve ter essa base, a máscara correspondente deverá ter um orifício na região que será construída a sonda. Após a aplicação de uma luz ultra-violeta, as regiões do substrato que não foram protegidas pela máscara, se tornam reativas e irão se ligar ao nucleotídeo específico. Esse passo é repetido para as três bases restantes. Máscaras subseqüentes irão construir a seqüência da sonda, base a base. Por exemplo, em um microarranjo feito por litografia no qual as sondas tenham um tamanho de 25 mer, serão necessárias 100 máscaras distintas, uma para cada base e para cada posição. Esta tecnologia permite a construção de microarranjos de alta densidade, mas o tamanho da sonda é limitado, pela probabilidade de erro inerente a cada um dos passos da síntese. Esse erro é muito pequeno, mas a probabilidade geral de se ocorrer um erro é aditiva, a cada passo de síntese, e para uma sonda muito grande, isso levaria à uma alta probabilidade de seqüências erradas. Uma alternativa mais flexível à utilização das máscaras é o uso de dispositivos de micro-espelhos. Com eles é possível determinar se certa região do substrato será ou não exposto à luz ultra-violeta através da reflexão da mesma na superfície do substrato. Micro-espelhos com capacidade de angulação determinam se o raio in-

cidirá ou não sobre a superfície do substrato, criando os sítios reativos para a adição da base.

- **Impressão por jato de tinta:** essa técnica utiliza os mesmos princípios utilizados pelas impressoras a jato de tinta. Quatro cartuchos são carregados com os diferentes nucleotídeos. Enquanto a cabeça de impressão se move pelo substrato, os nucleotídeos específicos são depositados nas posições necessárias.
- **Síntese eletroquímica:** utiliza pequenos eletrodos que estão no substrato. Com isso é possível gerenciar sítios de reação individual. Soluções contendo as bases são dispersadas sobre a superfície do substrato e os eletrodos são ativados nas posições necessárias em uma ordem predeterminada, construindo as seqüências das sondas base-a-base.

Muitas alterações na expressão de mRNA podem estar presentes na célula, mas isso pode ter pouco ou nada a ver com o fenômeno biológico estudado. Como causas dessa variação biológica real, mas pouco informativa, temos:

- O estado fisiológico da amostra biológica a ser estudada, seja por estímulos de origem interna (ciclo celular, senescência, controles internos do estado celular etc.) ou de origem externa (resposta a estímulos, como temperatura, luz, manipulação mecânica, nutrição etc.), quando esses fenômenos concomitantes não são de interesse ao pesquisador;
- Dinâmica rápida das alterações, as quais podem não ser captadas de forma homogênea pelas réplicas técnica;
- Complexidade na regulação das redes gênicas, as quais permitem uma faixa relativamente ampla de variações dos níveis de mRNA sem impacto biológico importante;
- O mRNA pode ser transcrito de forma rápida, mas sua tradução pode ser lenta. Portanto, qualquer medida de mRNA significa um instantâneo tirado de um único ponto temporal, podendo haver uma defasagem entre o que se observa no mRNA e o que está presente na célula como informação protéica;
- A meia-vida das proteínas pode ser tão variável quanto a dos mRNAs e essas meias-vidas podem não estar associadas de forma direta. Conseqüentemente, medidas de ex-

pressão gênica pelo transcriptoma podem não corresponder acuradamente à concentração da proteína.

Todos esses detalhes devem ser levados em consideração quando estamos analisando os dados. A escolha do método para análise é um processo que cabe ao pesquisador estudar e levantar as vantagens e desvantagens dos métodos as quais vão garantir um melhor desempenho diante sua aplicação. Para este trabalho foram utilizados métodos mais conservadores. Pois existe uma quantidade de métodos de análise disponíveis e aplicáveis. Mas tudo depende do desenho experimental, tipo celular estudado, pergunta biológica, etc.

### **1.8.1.3 Métodos utilizados para análise de expressão gênica**

Neste trabalho foi usado o microarranjo comercial Genechip<sup>®</sup> (Affymetrix Inc.), que consiste em uma versão de microarranjo de alta densidade de oligonucleotídeo com tamanho de 25 pares de base de comprimento como sondas de genes individuais. Nesse microarranjo, cada gene é representado por cerca de 14 a 20 pares de óligos, sendo que cada par consiste em uma sonda denominada *perfect match* ou PM (sonda perfeitamente complementar ao gene avaliado) e outra chamada *mismatch* ou MM (sonda que contém uma alteração de nucleotídeo na região central da sonda). A função da sonda MM é avaliar e corrigir as ligações não específicas das sondas.

Experimentos com microarranjos podem ter muitas variações sistemáticas, os quais podem ser causados por diferenças na eficiência da marcação das sondas, concentração de RNA ou eficiência na hibridização, dentre outros. Para a correção dessas variações em Genechip, muitos métodos foram propostos. Os mais comuns utilizados são: *Affymetrix Microarray Suite 5 method* (MAS 5.0, Affymetrix, 2002), Li & Wong (Li & Wong, 2001 a), RMA (*Robust Multi-array Analysis*, Irizarry, et. al. 2003) e o gcRMA (Wu, et. al., 2004).

### **1.8.1.4 Teste SAM**

Para o reconhecimento de genes diferencialmente expressos é importante o uso de um método que agregue confiabilidade estatística aos resultados. Um dos métodos estatísticos mais utilizados, adequado às características especiais da análise de microarranjo, é denominado teste SAM (*Significant Analyses of Microarray*), que constitui uma versão modificada do teste T e que

foi proposto por TUSHER *et al* (2001). Ele atribui um valor para cada gene, com base na mudança relativa da sua expressão e o desvio padrão dessa mesma mudança. Genes com valores maiores do que um limiar são considerados significativos.

Além de calcular uma estatística de expressão diferencial, o teste SAM fornece também uma medida de probabilidade de expressão gênica diferencial, a qual é denominada  $q$ , através do controle do FDR (*False Discovery Rate*). O FDR pode ser descrito como a proporção esperada de falsos positivos entre os genes diferencialmente expressos.

O número de genes considerado diferencialmente expresso é definido pelo valor de FDR desejado, o qual representa uma medida estatística de confiabilidade, e pela razão de mudança (*fold change* – FC), a qual representa uma medida de confiança biológica.

Os valores de FDR e FC são, portanto, escolhidos como uma combinação de significância estatística e biológica, de acordo com a necessidade do pesquisador.

O reconhecimento dos genes diferencialmente expressos, em experimentos de hibridações, depende de observações repetidas de cada condição biológica a ser avaliada. As repetições permitem investigar as variabilidades associadas aos procedimentos experimentais.

Conforme mencionado acima, esse teste se baseia em uma versão modificada do teste-t e tem as seguintes características:

- Ao teste-t clássico, é acrescentado um termo acessório, cuja função é diminuir o valor da estatística calculada, através do aumento da variância proposital da variância. Isto serve para evitar a atribuição de genes diferencialmente expressos quando o valor de variância é muito baixo, pois não houve réplicas suficientes para seu cálculo. Dessa forma, o teste se torna mais conservador.
- O cálculo da probabilidade de expressão diferencial não é baseado em uma distribuição clássica, como a de Student, mas é estimada dos próprios dados, através de permutação.
- Finalmente, é feita uma correção para múltiplos testes através do controle do FDR (*False Discovery Rate*).

#### **1.8.1.5 Clusterização**

A análise de agrupamento (*cluster analysis*) é um termo usado para descrever diversas técnicas numéricas cujo propósito fundamental é classificar os valores de uma matriz de dados sob estudo em grupos discretos. A aplicabilidade deste tipo de método em estudos com genômi-

ca funcional é arranjar genes de acordo com o padrão de similaridade da expressão gênica podendo-se neste caso atribuir, com maior confiabilidade, uma função comum destes genes não conhecidos, dentro do grupo formado.

Segundo DAVIS (1986) os diversos métodos para a análise de agrupamento podem ser enquadrados em quatro tipos gerais: métodos de partição; métodos com origem arbitrária; métodos por similaridade mútua e métodos de agrupamento hierárquicos.

Os métodos de agrupamento hierárquico são as técnicas mais comumente usadas. A partir da matriz inicial de dados obtém-se uma matriz simétrica de similaridade e inicia-se a detecção de pares de casos com a mais alta similaridade, ou mais baixa distância. Para essa combinação, segundo níveis hierárquicos de similaridade, escolhe-se entre os diversos procedimentos aglomerativos de tal modo que cada ciclo de agrupamento obedeça a uma ordem sucessiva no sentido do decréscimo de similaridade. Em termos computacionais, os métodos hierárquicos se tornam mais úteis quando se tem que manipular grandes matrizes de dados, por exemplo com mais de 1000 casos. Como “K” (nº de clusters) geralmente é pequeno, da ordem de 5 por exemplo, é mais rápido o manuseio de uma matriz de similaridade “k x n” do que uma com “n x n” dimensões.

Um dendrograma é um tipo específico de diagrama que organiza determinados fatores e variáveis. Resulta de uma análise estatística de determinados dados, em que se emprega um método quantitativo que leva a agrupamentos e à sua ordenação hierárquica ascendente - o que em termos gráficos se assemelha aos ramos de uma árvore que se vão dividindo noutros sucessivamente (figura 1.13). Isto é, ilustra o arranjo de agrupamentos derivado da aplicação de um algoritmo de agrupamento.

Um exemplo muito usado, em biologia computacional, é o do tipo específico de cladograma que mostra relações evolutivas entre diferentes clados biológicos (árvore filogenética), após a análise estatística dos dados genéticos.





## 2 Objetivo do trabalho

O presente trabalho se propõe a estudar o processo biológico ao nível transcricional da célula hospedeira diante à infecção causada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* através do uso da técnica de microarranjo de alta densidade. Devido às questões em aberto sobre a forma de regulação da expressão gênica da célula hospedeira frente essa interação com o parasita, escolhemos estudar a dinâmica de uma representação usual do transcriptoma da célula, no contexto de interação parasita-hospedeiro, utilizando o mRNA total.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar as mudanças na expressão gênica das culturas primárias de células musculares esqueléticas durante o tempo corrido de 30 minutos, 4 horas e 24 horas após a infecção;
- Identificar genes diferencialmente expressos na célula hospedeira durante a interação;
- Investigar como estes genes atuam na regulação e manutenção do processo de infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

Justificando este trabalho, gostaríamos de salientar a importância do *Toxoplasma gondii*, tanto como um problema de saúde pública quanto como um modelo interessante para estudarmos as modulações causadas a célula hospedeira por um patógeno intracelular evolutivamente bem adaptado. Neste sentido, uma avaliação destes transcritos durante o processo infeccioso se constitui em excelente objeto de estudo, não apenas por possuir um forte impacto médico, mas por dar oportunidade de avaliar essa relação de interação com o patógeno de uma forma mais detalhada a nível molecular, permitindo, *a posteriori*, concentrar e conduzir para perguntas de cunho biológico mais específicas, na tentativa de minar e compreender melhor os processos infecciosos.

O intuito do presente trabalho é somar conhecimentos voltados às alterações na célula hospedeira causadas pela interação com o parasita, selecionando genes candidatos e avaliando de uma forma ampla e paralela aos processos e redes de interação as quais estão sofrendo modulação se utilizando da metodologia de microarranjos de DNA.

## 3 Material e métodos

### 3.1 Obtenção de culturas primárias de células musculares esqueléticas

O procedimento adotado foi baseado nos trabalhos de ARAÚJO-JORGE *et al.* (1986) e BARBOSA *et al.* (2000).

Culturas primárias de células musculares esqueléticas (CME) foram obtidas de embriões de camundongos suíços com 18 dias de gestação. Basicamente, o tecido isolado é fragmentado em pequenas peças com bisturi e pinça, dissociado com enzimas proteolíticas, dando origem a células individualizadas que serão cultivadas em meio nutritivo, *in vitro*. Células musculares são dependentes de ancoragem, requerendo substrato sólido para promover a sua proliferação, metabolismo e diferenciação. O emprego de tecidos embrionários permite o acompanhamento do processo de miogênese, com a vantagem de serem estéreis desde o início do isolamento. Este tipo de tecido apresenta desagregação fácil e as células isoladas têm alta capacidade de adesão ao substrato, alta motilidade e excelente índice de multiplicação e diferenciação celular *in vitro*.

#### 3.1.1 Material:

- Fêmeas de camundongos suíços grávidas com 18 a 20 dias de gestação
- Ringer
- PBS
- Tripsina
- Colagenase
- Gelatina
- L-glutamina
- Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Antibióticos: estreptomicina e penicilina
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
- Soro fetal bovino

- Soro de cavalo
- Extrato embrionário de pinto
- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)
- Placas de Petri de vidro(100 x 15 mm e 35 x 10 mm)
- Erlenmeyer de 50 ml contendo barra magnética (8 x 3 mm)
- Pipetas Pasteur
- Pipetas sorológicas de 2 e 5 ml
- Lamínulas redondas de vidro (15 x 0,13 mm)
- Tubos cônicos de 15 ml
- Pinças de ponta dente de rato (12 cm) e ponta curva (10 cm), tesoura cirúrgica ponta curva ou reta (12 cm) e bisturi (15 cm)
- Gaze estéril
- Placa de cortiça e alfinete
- Câmara mortuária
- Material plástico para plaqueamento (garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, placas de 24 poços, placas de 35 mm)
- Solução de dissociação: tripsina associada a verseno.

O material deve ser embalado apropriadamente e esterilizado em autoclave a 1 atm (120°C) por 20 minutos

### **3.1.2 Procedimento**

- Anestesiá as fêmeas grávidas em câmara mortuária contendo dióxido de carbônico (CO<sub>2</sub>) + deslocamento cervical. Levar o animal para o fluxo laminar, fixá-lo na placa de cortiça e esterilizar a área de dissecação (área abdominal) com álcool 70%;
- Abrir o abdômen expondo a membrana peritoneal. Com material cirúrgico estéril, abrir a cavidade peritoneal e remover o útero contendo os embriões, transferindo-os para uma placa de Petri (100 x 15 m) contendo solução de Ringer no gelo;
- Remover as coxas traseiras dos embriões e transferi-las para uma placa de Petri (100 x 15 m) com placa de Petri (35 x 10 m) contendo solução de Ringer. Dissecar o material, reti-

rando a pele, os ossos e cartilagem. Fragmentar o tecido muscular sobre a lâmina escavada, transferindo os fragmentos para outra placa de Petri (100 x 15 mm) com uma placa de Petri (35 x 10 mm) contendo solução de Ringer no gelo;

- Transferir os fragmentos para Erlenmeyer de 50 ml contendo barra magnética, lavar 2 vezes em solução de Ringer para remoção das células sanguíneas e posteriormente lavar em PBS (sem cálcio e magnésio) sob agitação por 5 minutos a 37°C;
- Realizar a dissociação enzimática:
  - Solução final (v/v): 0,05% tripsina + 0,01% de verseno em PBS (solução pré-aquecida, estéril, a 37°C em banho-Maria);
  - Expor os fragmentos do tecido à dissociação seqüencial por 5 minutos a cada etapa a 37°C, sob agitação magnética, até completa digestão do tecido;
  - Recolher o líquido de dissociação contendo células isoladas e transferi-lo para tubos de centrífuga de 15 ml) contendo 2 ml de meio DMEM completo, suplementando com 0,5 ml de soro fetal bovino. Manter os tubos no gelo a fim de inativar a atividade enzimática. Marcar os tubos a cada etapa da dissociação;
  - Controlar ao microscópio óptico de contraste de fase o padrão morfológico, a viabilidade celular e o número de células obtidas, após cada dissociação;
- Centrifugar os tubos com células a 1800 rpm (500 g) por 5 minutos. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em DMEM completo. Repetir este procedimento mais uma vez, objetivando lavar as células e eliminar as enzimas proteolíticas. Manter as células no gelo até o seu plaqueamento;
- Utilizar uma alíquota da suspensão celular para avaliação do número de células em câmara de Neubauer;
- Iniciar o plaqueamento seqüencial para obtenção de culturas ricas em mioblastos: plaquear as células (0,8 a  $1 \times 10^6$  células) em garrafas de 25 mm<sup>2</sup> previamente revestidas com gelatina 0,01%;
- Após 15 a 30 minutos de plaqueamento, uma alta proporção de fibroblastos irá aderir ao substrato, devido a sua velocidade de adesão ser mais rápida do que a dos mioblastos. Recolher o sobrenadante rico em mioblastos, plaquear as células em recipientes previa-

mente revestidos com gelatina. A densidade celular de plaqueamento varia de acordo com a área do substrato;

- Placas de 24 poços, com diâmetro de 18 mm:  $15 \times 10^5$
- Garrafas de plásticos de 25 cm<sup>2</sup>:  $2 \times 10^6$
- Placa de Petri com diâmetro de 35 mm: 0,8 a  $1 \times 10^6$
- Trocar o meio de cultivo após 24 horas, para remoção de células mortas e “debris” celulares. Manter as células a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sendo a troca do meio efetuada a cada 2 dias.

As células foram cultivadas por períodos de 7 dias para obtenção de fibras musculares e infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, mantendo-se uma relação célula hospedeira-parasita de 1:5.

### **3.1.3 Característica da cultura**

A miogênese de células musculares esqueléticas *in vitro* obedece a uma seqüência de transformações morfológicas nas primeiras 24 horas de cultivo. Mioblastos dividem-se e migram na cultura, se alinhando a outros mioblastos. Após 24 horas, estes mioblastos são competentes para a fusão e se transformam em miotubos jovens pela fusão de mioblastos, que não mais se dividem e são predominantemente binucleados. A partir de 48 horas formam-se os miotubos maduros que se originam da fusão de vários miotubos jovens e ainda mioblastos, sendo então multinucleados. Da fusão de miotubos maduros formam-se as miofibrilas em torno do quinto ou sexto dia de cultivo. A contração espontânea ocorre após 10 dias de cultivo.

### **3.1.4 Soluções e Meios de cultura**

Todas as soluções e meios devem ter seu pH aferido antes de se iniciar a cultura.

**Solução de Ringer pH 7,0:** NaCl 154 mM, KCl 56,28 mM, CaCl<sub>2</sub> 17mM. Esterilizar em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

**Solução de PBS pH 7,0:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,88 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mM

*Solução de gelatina 0,01%:* Dissolver a gelatina em solução de Ringer pH 7,0 sob aquecimento. Esterilizar em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

*Solução de bicarbonato de sódio:* NaHCO<sub>3</sub> 333 mM. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm

*Solução de Cloreto de Cálcio:* CaCl<sub>2</sub> 25mM. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm

*Solução de tripsina 0,1%:* Dissolver a tripsina em PBS pH 7,0. Deixar sob agitação por cerca de 7 horas a 4°C. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm

*Solução de colagenase 0,8%:* Dissolver a colagenase em PBS pH 7,0. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm

*Solução de EDTA ou Verseno 0,02%:* Dissolver em PBS pH 7,0. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm

*Solução estoque de penicilina – estreptomicina:* Dissolver a penicilina para uma concentração final de 10.000 U por ml; dissolver a estreptomicina para uma concentração final de 10 mg por ml. Diluir 10 vezes para uso.

*Meio Eagle (pH 6,8):* Meio Eagle MEM 13,4 g; Nitrato férrico (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 0,001g por L, diluído em 10 ml. Acrescentar 10 ml da solução de estoque de penicilina-estreptomicina. Acrescentar água tridestilada qsp 1000 ml. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm.

*Meio Eagle completo (ph 6,8):* 73 ml de meio Eagle, 10 ml de soro de cavalo inativado por 30 minutos a 56°C, 5 ml de soro fetal bovino inativado por 30 minutos a 56°C, 10 ml de solução de CaCl<sub>2</sub> a 25mM, 1 ml de L-glutamina a 200 mM, 1 ml de extrato embrionário. Ajustar o pH com bicarbonato de sódio se pH estiver ácido, ou gás carbônico, se o pH estiver básico. Filtrar de forma estéril em membrana com poro de 0,2 µm.

### **3.2 Obtenção dos parasitas**

O procedimento utilizado foi o descrito por CARVALHO & DE SOUZA (1989).

As formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidas por passagem intraperitoneal com inóculo de  $2 \times 10^6$  parasitas em fêmeas de camundongo suíços pesando aproximadamente de 18 a 21g de acordo com as condições estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea). Os parasitas foram coletados em tampão de fosfato (PBS) pH 7,2 após 48 a 72 horas de infecção. Para se obter os parasitas, células infectadas de camundongo foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a temperatura ambiente para remover as células e “debris”. O sobrenadante que continham os parasitas foi coletado e centrifugado a 1000g por 10 minutos. O “pellet” obtido foi lavado de 2 a 3 vezes com PBS, pH 7,2, e finalmente ressuspensionado em meio DME sem soro a uma densidade de 106 parasitas por ml em PBS, pH 7,2.

### **3.3 Preparação do material para microarranjo (GeneChip®)**

#### **3.3.1 Lista de material utilizado**

##### **3.3.1.1 Isolamento de RNA total**

*Reagente TRIzol*: Invitrogen Life Technologies, P/N 15596-018 ou reagente lítico QIAzol™: QIAGEN, P/N 79306

*Mini Kit RNeasy*: QIAGEN, P/N 74104

##### **3.3.1.2 Isolamento de mRNA Poli-A+**

*Kit Oligotex Direct mRNA (isola o mRNA das células)*: QIAGEN, P/N 72012, 72022, ou 72041

*Kit Oligotex mRNA*: QIAGEN, P/N 70022, 70042, ou 70061

*QIAshredder*: QIAGEN, P/N 79654 (usar somente com Kit QIAGEN Oligotex Direct)

*Água Tratada com DEPC*: Ambion, P/N 9920

##### **3.3.1.3 Síntese e Marcação da Primeira Fita**

*Kit GeneChip® IVT de marcação* (Affymetrix, P/N 900449);

*Kit GeneChip® One-Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix, P/N 900431);

*GeneChip® Sample Cleanup Module* (Affymetrix, P/N 900371);

*GeneChip® Poly-A RNA Control* (Affymetrix, P/N 900433);

*Kit GeneChip® Hybridization Control* (Affymetrix, P/N 900454).



#### **3.3.1.4 Síntese e marcação da segunda Fita**

*Kit GeneChip® Two-Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix, P/N 900432);

*Kit GeneChip® IVT cRNA Cleanup* (Affymetrix, 900547).

#### **3.3.1.5 Outros reagentes**

*TBE 10X*: Cambrex, P/N 50843;

*Álcool absoluto*: mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitação de RNA;

*estoque de etanol*: mantido a temperatura ambiente para usar com *GeneChip Sample Cleanup Module* e Kit IVT cRNA;

*Etanol 80%*;

*SYBR Green II*: Cambrex, P/N 50523;

*Pellet Paint*: Novagen, P/N 69049-3 (optional)

*Glicogênio*: Ambion, P/N 9510 (optional)

*Acetato de sódio 3M (NaOAc)*: Sigma-Aldrich, P/N S7899

*Brometo de Etídeo*: Sigma-Aldrich, P/N E8751

*NaOH 1N*

*HCl 1N*

#### **3.3.1.6 Outros equipamentos**

*Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, RNase-free*: USA Scientific P/N 1415-2600

*Micropipetadores (P-2, P-20, P-200, P-1000)*: Rainin Pipetman ou equivalente

Ponteiras RNase-free, com filtro estéril

*Aparato de mini-gel de agarose com tampões apropriados*

*Espectofotômetro UV*

*Tubos de centrífuga RNase-free de 0,5 ml e 1,5 ml*: Ambion, P/N12350 and P/N 12450, respectivamente

### **3.3.2 Procedimento**

#### **3.3.2.1 Extração de RNA**

Foi utilizado o kit de extração RNAeasy (Qiagen) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante para extração de RNA total de  $1 \times 10^6$  células de cada amostra, assim como de

células musculares esqueléticas de camundongo não infectados. A concentração do RNA foi medida pela densidade óptica da solução de ácido nucléico em 260 nm.

### 3.3.2.2 Síntese de cDna

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foi seguido o esquema representado na tabela 3.1 utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador T7-(dT)<sub>24</sub> (5' – GGCCAGTGAATTGTAATAC-GACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)<sub>24</sub> – 3') e reagentes da Invitrogen.

Tabela 3.1. Esquema para síntese da primeira fita de cDNA.

	Reagentes	Volume	Concentração final
1. <i>Hibridação com iniciador</i>	Água tratada com DEPC	q.s.p. 20 µl	-
Incubar a 70 °C por 10 minutos	T7-(dT) <sub>24</sub> (100 pmol/µl)	1 µl	100 pmol
Centrifugação rápida e banho de gelo	RNA	q.s.p. 5 µg	5 µg
2. <i>Ajuste de Temperatura</i>	Tampão para primeira fita 5X	4 µl	1X
Adicionar e misturar bem	DTT 0,1 M	2 µl	10 mM
Incubar a 42 °C por 2 minutos	10 mM de cada dNTP	1 µl	500 µM/cada
3. <i>Síntese da primeira fita</i>	SuperScript II RT		
Adicionar e misturar bem	(200 U/µl)	1 µl	200 U
Incubar a 42 °C por 1 hora			
Volume total		20 µl	

Após a última incubação, os tubos contendo a mistura de reação acima foram centrifugados brevemente e colocados em gelo. Para a síntese da segunda fita do cDNA, seguiu-se o esquema representado na tabela 3.2 utilizando-se reagentes da Invitrogen, que foram misturados e incubados a 16 °C por 2 horas.

Tabela 3.2. Esquema para síntese da segunda fita de cDNA.

Reagentes	Volume	Concentração final
Água tratada com DEPC	91 µl	-
Mistura de reação da primeira fita	20 µl	-
Tampão para segunda fita 5X	30 µl	1X
10 mM de cada dNTP	3 µl	200 µM de cada
DNA ligase de <i>E.coli</i> (10 U/µl)	1 µl	10 U
DNA polimerase I de <i>E.coli</i> (10 U/µl)	4 µl	40 U
Rnase H de <i>E. coli</i> (2 U/µl)	1 µl	2 U
Volume total	150 µl	

Foram adicionados 2  $\mu$ l (10 U) de T4 DNA polimerase e os tubos foram incubados a 16°C por 5 minutos e, por fim, foram adicionados 10  $\mu$ l de EDTA 0,5 M.

### 3.3.2.3 Purificação de cDna

A totalidade do volume final da reação de síntese de cDNA (162  $\mu$ l) foi misturada com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 – saturado com 10 mM de Tris-HCl pH 8 e 1 mM de EDTA) e agitado em vórtex. Essa mistura foi transferida para tubos *Phase Lock Gel* (Eppendorf) previamente preparados (centrifugação a  $\geq 12.000 \times g$  por 20 a 30 segundos). Os tubos foram centrifugados a  $\geq 12.000 \times g$  por 2 minutos e a fase aquosa contendo o cDNA, que foi separada da fase orgânica pelo gel contido no tubo, foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml.

Foram adicionados 0,5 volume de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto (armazenado a -20 °C) e os tubos foram colocados em agitação no vórtex brevemente sendo, logo em seguida, centrifugados a  $\geq 12.000 \times g$  por 20 minutos a temperatura ambiente para que ocorresse a precipitação do ácido nucléico. O sobrenadante foi decantado e o precipitado foi lavado com etanol 80% (armazenado a -20 °C), sendo centrifugado a  $\geq 12.000 \times g$  por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida. Após secagem ao ar, o precipitado foi ressuspenso em 12  $\mu$ l de água tratada com DEPC.

### 3.3.2.4 Síntese de cRna Biotinilado

O volume total do cDNA purificado foi utilizado para a síntese de cRNA biotinilado numa reação de transcrição *in vitro*. Foi utilizado o kit *BioArray<sup>TM</sup> High Yield<sup>TM</sup> RNA Transcript Labeling Kit* (Enzo Diagnostics) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O produto da reação foi purificado com o kit RNeasy (Qiagen) segundo as instruções do fabricante para purificação de RNA e a concentração foi medida pela densidade óptica da solução de ácido nucléico em 260 nm.

Uma vez que foi utilizado RNA total para a síntese do cDNA, foi necessário corrigir o valor da quantidade de cRNA antes de utilizá-lo para os experimentos de hibridação para refletir a presença de RNA não marcado. A correção foi feita subtraindo-se a quantidade de RNA total utilizada no início do processo da quantidade de cRNA medida após a purificação, segundo recomendação da *Affymetrix (GeneChip® Expression Analysis – Technical Manual)*.

### 3.3.2.5 Fragmentação de cRna

Para a reação de fragmentação o cRNA deve estar numa concentração mínima de 0,6 µg/µl. Se a concentração for menor que esta, pode-se recorrer à precipitação com etanol.

Foi fragmentada quantidade suficiente de cRNA de cada amostra para ser utilizada na hibridação, sendo que foi utilizado o valor de quantidade corrigido. Foram adicionados 2 µl de tampão de fragmentação 5X para cada 8 µl de cRNA mais água. Este tampão é ótimo para fragmentar moléculas de cRNA completas em fragmentos de 35 a 200 bases por hidrólise induzida por metal.

A reação foi incubada a 94°C por 35 minutos e imediatamente colocada em banho e gelo. As amostras foram estocadas a -20°C até serem utilizadas para os experimentos de hibridação.

### 3.3.2.6 Hibridação com o Genechip®

Foram utilizados arranjos do tipo MG74Av2 que contêm 12.422 conjuntos de sondas, compreendendo aproximadamente 12.000 genes murinos. Os arranjos previamente equilibrados a temperatura ambiente foram umedecidos com 250 µl de tampão de hibridação 1X, introduzidos por um dos septos do cartucho (figura 3.1) deixando-se o outro para saída de ar e incubados a 45°C por 10 minutos com rotação.

Foi preparada uma mistura de reação para cada amostra segundo a tabela 3.3, tomando-se o cuidado de aquecer previamente a solução estoque de controles de hibridação eucarióticos 20X a 65°C por 5 minutos para a completa ressuspensão do cRNA.

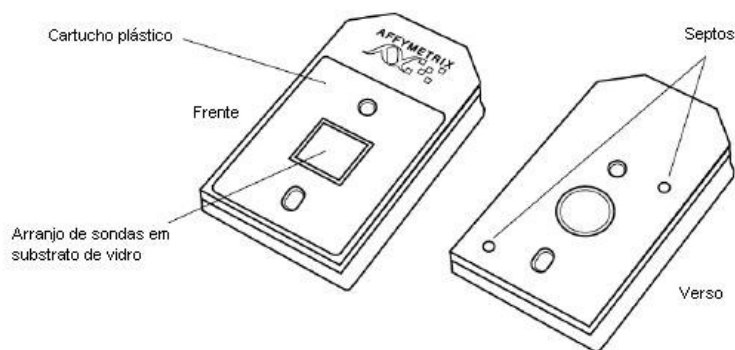


Figura 3.1. Representação esquemática do arranjo de sondas GeneChip®.

A mistura de reação foi aquecida a 99°C por 5 minutos e logo em seguida resfriada a 45°C por 5 minutos.

Os tubos contendo as misturas de reação foram centrifugados por 5 minutos na velocidade máxima da centrífuga para remover qualquer material insolúvel. A solução tampão foi removida dos cartuchos e substituída pela mistura de reação clarificada. Os cartuchos foram acondicionados em caixas do tipo *rotisserie* em forno de hibridação a 45°C e hibridados por 16 horas com velocidade de rotação de 60 rpm.

Tabela 3.3. Mistura de reação para hibridação.

Reagentes	Volume	Concentração final
Água ultra pura	q.s.p 300 µl	-
cRNA fragmentado	15 µg	0,05 µg/µl
Oligonucleotídeo B2 Controle (3 nM) (Affymetrix)	5 µl	50 pM
Controles de hibridação eucarióticos 20X ( <i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i> ) (Affymetrix)	15 µl	1,5, 5, 25 e 100 pM respectivamente
DNA de esperma de arenque (10mg/ml)	3 µl	0,1 mg/ml
BSA acetilada (50 mg/ml)	3 µl	0,5 mg/ml
Tampão de hibridação 2X (item 3.1.3)	150 µl	1X
Volume total	300 µl	

### 3.3.2.7 Lavagem e coloração do Genechip®

Todo o processo de lavagem e coloração foi feito na estação fluidica *GeneChip® Fluidics Station 400* de acordo com a seguinte programação: 10 ciclos de 2 *mixes*/ciclo com tampão A a 25°C, 4 ciclos de 15 *mixes*/ciclo com tampão B a 50°C, tampão SAPE por 10 minutos a 25°C, 10 ciclos de 4 *mixes*/ciclo com tampão A a 25°C, solução de anticorpo por 10 minutos a 25°C, tampão SAPE por 10 minutos a 25°C e 15 ciclos de 4 *mixes*/ciclo com tampão A a 30°C. A temperatura de espera foi de 25°C.

### 3.3.2.8 Leitura Óptica do Genechip®

Os arranjos de sonda foram lidos em um *scanner GeneArray® Scanner (Affymetrix)*, equipado com laser de íon argônio, programado segundo as instruções do fabricante, atribuindo-se 3 µm para o valor de pixel e comprimento de onda de 570 nm. A captura das imagens e análise

inicial das hibridações foram feitos com o *software MicroArray Suite 5.0 – MAS (Affymetrix)* e os arquivos gerados foram salvos em formato (.cel).

### **3.4 Amostras estudadas**

As culturas de célula muscular esquelética e de parasitas foram preparadas conforme descrito acima. O processo de infecção foi iniciado através da colocação em contato de uma proporção de 5 parasitas por célula hospedeira. As culturas foram fracionadas para produzir as seguintes amostras independentes:

- **Controle 4 horas (C04):** constitui-se de uma cultura de células musculares esqueléticas sem o parasita, sendo que o processo foi parado após 4 horas do início do experimento. Foi utilizado como controle para os tempos de 30 minutos e quatro horas de infecção (ver abaixo)
- **Controle 24 horas (C24):** constitui-se de uma cultura de células musculares esqueléticas sem o parasita com o processo sendo parado após 24 horas de início do experimento.
- **Infectado 30 minutos (I30):** uma amostra sem parasita, após 3 horas e 30 minutos do início do experimento, foi colocada em contato com *Toxoplasma gondii* na proporção acima descrita. Com isso, os eventos celulares de adaptação ao meio são equivalentes a uma amostra controle 4 horas, mas os achados da infecção se referem a 30 minutos de infecção.
- **Infectado 4 horas (I04):** uma cultura independente de células musculares esqueléticas foi colocada em contato com parasitas por 4 horas.
- **Infectado 24 horas (I24):** uma cultura independente de células musculares esqueléticas foi colocada em contato com parasitas por 24 horas.

É importante salientar que as amostras são independentes, isto é, a cultura infectado por 4 horas não é uma alíquota de uma mesma cultura que seria acompanhada até 24 horas. Com isso, obtém-se uma medida da variação biológica dos achados, pois todas as infecções são independentes.

Essa unidade experimental, consistindo de cinco amostras, foi repetida mais uma vez, agregando ainda mais controle da variação biológica do que somente o uso de infecções independentes.

### **3.5 *Desenho experimental***

Uma das questões mais importantes na implementação de um experimento de microarranjo é o desenho experimental. A forma como as hibridações serão planejadas possui impacto muito grande sobre a capacidade de se inferir informações biológicas, bem como questões financeiras relativas ao gasto de material e logísticas, como a quantidade de mRNA disponível para a análise. Esse tipo de problema é menos importante ao se utilizar a plataforma Genechip, pois nesse caso somente uma amostra é hibridada em cada microarranjo, utilizando-se somente um único marcador fluorescente. Foram utilizados 10 microarranjos nesse estudo, para avaliar as cinco amostras (dois controles: C04 e C24; três infectados: I30, I04 e I24), em duas unidades de replicação biológica.

### **3.6 *Etapas da análise***

Após obter a imagem escaneada foi utilizado o programa MAS (Affymetrix Inc.) para a extração das informações referentes aos dados de hibridação das sondas. Há diversos métodos de análise de imagem de microarranjos. No entanto, todos os métodos possuem três etapas principais:

- **Gradeamento:** Sendo os elementos dispostos em uma estrutura regular, a imagem é submetida ao programa, onde são calculadas as dimensões para a identificação do conjunto de pontos da imagem (pixels) que formam a sonda. Esta etapa é auxiliada no Genechip pela existência de diversas sondas nas bordas do microarranjo que sempre estarão com sinal forte;
- **Segmentação:** nessa etapa, a área referente à sonda é identificada e delimitada, sendo que os valores dos pixels internos a essa delimitação serão utilizados, no próximo passo, para o cálculo da intensidade. Novamente, este passo é feito de forma muito facilitada no

Genechip, pois praticamente toda a área da sonda está ocupada com material, pelo fato de que a síntese é realizada *in situ*.

- **Quantificação:** o objeto final do processamento da imagem é computar um valor único que potencialmente é diretamente proporcional à quantidade de mRNA presente na solução hibridada. Um valor desse tipo deve ser calculado para cada sonda no microarranjo. Normalmente os valores da sonda são quantificados extraíndo-se a média de intensidade de todos os pixels pertencentes à área interna da máscara obtida no passo anterior.

### 3.6.1 Métodos de Análise dos Dados

A forma como o Genechip avalia a expressão de um determinado gene consiste no uso do que se denomina um *ProbeSet*. Um *ProbeSet* consiste em um conjunto de 16 pares de sondas (no modelo MG74Av2) PM e MM, que estão distribuídas ao longo do mRNA. Portanto, os valores finais de intensidade de hibridação, que representam uma estimativa da concentração original do mRNA na amostra estudada, são obtidos através da sumarização de, potencialmente, 32 valores de hibridação de uma determinada sonda.

Antes de se chegar ao valor final de intensidade, diversas etapas devem ser realizadas, as quais serão detalhadas a seguir. Diversos métodos de análise de dados de Genechip foram propostos, os quais apresentam diferenças na forma como essas etapas são feitas; infelizmente, não existe consenso a respeito de qual método é o melhor e, possivelmente, isso não é possível, pois o método de escolha depende da finalidade do estudo.

As etapas de análise de resultados de hibridação com o Genechip são as seguintes:

- **Correção do *background*:** Normalmente, em microarranjos de cDNA ou oligonucleotídeos spotados, o *background* representa a fluorescência basal do substrato no qual foram depositadas as sondas, isto é, um valor de intensidade referente ao ruído inerente do material que não hibrida especificamente com os elementos contidos na amostra. No Genechip, por ser sintetizado *in situ*, praticamente não há nenhuma região da lâmina na qual não tenha sonda e, portanto, a fluorescência é em sua maior parte oriunda da hibridação específica da sonda com o material da amostra. Alguns autores denominam a eliminação de hibridação cruzada de correção de *background*.



- **Normalização:** nessa etapa do processo, as alterações sistemáticas da intensidade do sinal, como diferenças no processo de produção do material a ser hibridado, marcação e hibridação, são eliminadas.
- **Correção da hibridação cruzada:** Algumas vezes, chama-se de correção do *background* em Genechip a eliminação da hibridação com relação a mRNAs para os quais as sondas não foram desenhadas, isto é, a hibridação cruzada. Para corrigir tal fenômeno foram incorporadas as sondas MM que são exatamente idênticas às sondas PM, com exceção do nucleotídeo central, o qual teria o maior potencial em desestabilizar o pareamento da sonda MM com o alvo correto da sonda PM. No entanto, tal correção é imperfeita, pois a sonda MM apresenta hibridação específica com o alvo correto e a simples eliminação do valor de hibridação da sonda MM, procedimento realizado pelo algoritmo de análise sugerido pelo próprio fabricante (algoritmo MAS 5.0), aumentaria o ruído da análise. Essa etapa é considerada a que cria as maiores diferenças nos resultados dos diferentes métodos de análise de Genechip.
- **Sumarização dos dados do ProbeSet:** conforme mencionado acima, no Genechip a quantificação do nível de expressão de um determinado mRNA é feito através do uso de um conjunto de sondas distribuídas ao longo desse mRNA. Portanto, um determinado mRNA é avaliado por um conjunto de sondas, denominado ProbeSet, cujos valores individuais devem ser resumidos a um único valor de expressão. Essa etapa pode ser feita de diversas formas e a esse processo é dado o nome de sumarização.

Para estimar o valor do índice de expressão dos genes nos experimentos deste trabalho foram utilizados dois métodos distintos de análise:

- **Li-Wong** (LI & WONG, 2001a; LI & WONG, 2001b): o qual utiliza os seguintes passos referentes às etapas supra-citadas: sem correção de *background*, normalização pelo conjunto invariável de sondas (*invariant set normalization*), não utilização dos dados das sondas MM, não corrigindo para hibridação cruzada e sumarização pelo método de Li-Wong, que consiste em um modelarização do fenômeno de hibridação.
- **gcRMA** (WU *et al.* 2004): o qual utiliza os seguintes passos referentes às etapas supra-citadas: correção de *background* pelo método RMA (IRIZARRY *et al.*, 2003), normalização

pelo métodos dos quantiles (BOLDSTAD *et al.*, 2003), utilização dos dados das sondas MM através do método gcRMA, que utiliza o conteúdo GC das sondas MM para extrair a hibridação inespecífica de forma mais acurada e sumarização pelo alisamento de medianas (*median polish*).

A motivação em se utilizar dois métodos de análise que processam de forma distinta os dados é justificada pelo fato de que esses dois métodos possuem procedimentos bem diferentes de processamento dos dados, representando portanto possivelmente dois extremos da análise de dados de Genechip. Além disso, um dos métodos (Li-Wong) não utiliza as sondas MM para a determinação da expressão gênica, enquanto que o gcRMA utiliza um tratamento elegante das mesmas; conforme descrito acima, as diferenças nos resultados dos diferentes métodos é causada principalmente pela forma como as sondas MM são analisadas.

As análises dos dados resultantes da hibridação foram realizadas pelo pacote de funções Affy, o qual está disponível no *software* de análise Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

### **3.6.2 Reconhecimento de genes diferencialmente expressos**

Para a determinação dos genes diferencialmente expressos, a partir dos dados oriundos do processamento pelos dois métodos de análise supra-citados, foi utilizado o teste SAM, que permite a determinação com confiança da expressão diferencial

O teste SAM computa uma estatística, denominada  $d$ , a qual é calculada pela seguinte fórmula, para um dado gene  $i$ , dentre os  $p$  genes avaliados:

$$d_i = \frac{r_i}{s_i + s_0}; i = 1, 2, \dots, p$$

Na qual  $r_i$  é um escore,  $s_i$  é o erro padrão e  $s_0$  é um fator de correção. A estatística  $d_i$  é similar ao teste  $t$  de Student, com exceção do fator de correção, o qual torna o teste mais conservador, o que é muito importante em experimentos de microarranjos nos quais o número de réplicas experimentais é baixo.

Após o cálculo da estatística, é feita uma permuta dos dados a fim de calcular a distribuição nula da mesma, para que a probabilidade de que ausência de expressão diferencial seja atribuída de forma errônea seja calculada. Finalmente, o teste SAM realiza a correção para testes múltiplos, fenômeno extremamente importante em estudos de microarranjos nos quais dezenas de milhares de testes são produzidos. Essa correção é feita através da determinação da taxa de descobertas falsas (FDR, *false discovery rate*), que é definido como a proporção de falso-positivos dentre os elementos considerados diferencialmente expressos.

Para a análise estatística do presente trabalho foi utilizada a opção de teste multi-classes, no qual o escore e o erro padrão são calculados da seguinte forma:

$$r_i = \left[ \left\{ \frac{\sum n_k}{\prod n_k} \right\} \sum_{k=1}^K n_k (\bar{x}_{ik} - \bar{x}_i)^2 \right]^{1/2}$$

$$s_i = \left[ \frac{1}{\sum (n_k - 1)} \cdot \left( \sum_{k=1}^K \frac{1}{n_k} \right) \sum_{k=1}^K \sum_{j \in C_k} (x_{ij} - \bar{x}_{ik})^2 \right]^{1/2}$$

Nas quais há K classes (as cinco amostras no presente trabalho),  $C_k$  é os índices de observações na classe K,  $n_k$  é o número em  $C_k$ ,  $\bar{x}_{ik}$  equivale a  $\sum_{j \in C_k} x_{ij}/n_k$  e  $\bar{x}_i$  equivale a  $\sum_j x_{ij}/n$ .

Após a realização do teste SAM multi-classes nos dados obtidos das cinco amostras, com duas réplicas biológicas, são escolhidos os valores limites para a listagem dos genes diferencialmente expressos de acordo com dois critérios: valor limite da razão de mudança (FC, *fold change*) e valor limite de FDR. No presente trabalho, foram escolhidos os valores 1,75 para FC e 5% para FDR. Após a escolha desses valores, o programa produz uma listagem dos genes que foram considerados diferencialmente expressos entre pelo menos duas das cinco amostras, cuja razão de mudança, em módulo, fosse igual ou superior a 75% e cuja proporção de falso-positivos dentre os genes considerados diferencialmente expressos fosse de 5%.

### 3.7 Análise por agrupamento

Para a análise de agrupamento dos genes selecionados na etapa anterior, foi utilizado o método de clusterização hierárquica do UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic*

*Average*), a partir do cálculo de distância euclidianas dos dados referentes à expressão diferencial nas três amostras infectadas comparadas com os seus controles (EISEN *et al.*, 1998).

Essa análise foi realizada com o programa Cluster 3.0 (<http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/>) e a visualização do dendrograma resultante foi feito com o programa Java TreeView (<http://jtreeview.sourceforge.net/>).

### **3.8 Análise por ontologia gênica**

A fim de caracterizar de forma rápida e precisa as características biológicas dos genes considerados diferencialmente expressos, conforme descrito no item 3.6.2, foi realizada uma análise através de uma ontologia gênica. A ontologia gênica desenvolvida pelo projeto Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>) representa uma iniciativa importante para a utilização de termos claros e únicos para a descrição dos produtos gênicos. Essa ontologia é organizada de forma estruturada e hierárquica, em um gráfico acíclico, classificando os genes de acordo com três critérios: processo biológico associado, componente celular e função molecular. Essa análise foi realizada através do programa GO Browser, o qual permite a visualização da distribuição dos termos GO em uma estrutura do tipo de gráfico acíclico, e que está disponível no seguinte endereço: <https://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>.

Posteriormente, através da análise de agrupamento descrito no item 3.7, foram obtidos grupos de genes que tiveram sua expressão co-modulada durante a infecção. A distribuição diferencial dos termos GO foram comparados através de um teste estatístico de Fisher, através do programa eGOn (<http://nova2.idi.ntnu.no/egon/>), visando identificar termos que estavam sobre ou sub-representados entre os grupos de genes co-modulados.

### **3.9 Análise por redes gênicas**

O programa *Ingenuity Pathways Analysis* 3.1 foi utilizado para a análise das redes gênicas que se apresentam com maior grau de mudança no processo de infecção por *Toxoplasma*. Esse programa possibilita a análise dos dados de microarranjo de forma integrada a um banco de dados de conhecimento sobre vias biológicas. Esse tipo de análise, que não é baseada em achados individuais (genes), mas sim em um nível (vias biológicas) mais compatível com dados ob-

tidos em larga escala, como os oriundos de experimentos de microarranjo, representa uma forma mais apropriada e extremamente poderosa para uma melhor descrição do fenômeno estudado.

A base de conhecimento de vias biológicas da Ingenuity representa o maior banco de dados mundial, curado, de redes biológicas criados a partir de milhões de relações, modeladas individualmente, de relações entre proteínas, genes, complexos, células, tecidos, drogas e doenças. O processo de produção dessa base passa pela análise da literatura por dois especialistas, os quais extraem as relações existentes entre os elementos, classificam-nas a partir de uma ontologia desenvolvida pela própria empresa, com mais de 300.000 termos distintos.

## 4 Resultados

### 4.1 Descrição

A avaliação do transcriptoma durante o processo de infecção por *T. gondii* em culturas de células primárias de músculo esquelético através do uso de microarranjos de DNA permite a identificação de genes cujos níveis de mRNA mudam durante esse processo. Esses genes podem estar envolvidos diretamente na determinação do processo infeccioso, e serão denominados de genes de função potencial direta, mas também podem ter seus níveis de mRNA alterados de forma secundária aos eventos diretos, e serão denominados genes de função potencial indireta.

Além da identificação de genes candidatos a estarem atuando, direta ou indiretamente, no processo infeccioso, a utilização de microarranjos de DNA permite avaliar o processo de forma menos qualitativa, a qual seria representada pela identificação e descrição dos genes diferencialmente expressos. Essa avaliação mais quantitativa do processo pode ser feita de diferentes formas, desde a contagem de genes diferencialmente expressos em cada etapa do processo, até a utilização de técnicas que avaliam os dados em dimensionalidades maiores, como o cálculo de distâncias inter-gênicas baseadas nos valores de expressão diferencial e posterior agrupamento das amostras através das distâncias calculadas.

No presente trabalho, diferentes abordagens quantitativas e qualitativas foram utilizadas para a obtenção de sumarizações dos dados. É muito importante salientar que, em estudos genômico funcionais, a quantidade de dados obtida é muito grande e o número de técnicas analíticas passíveis de serem utilizadas é ainda maior. O espectro de possíveis análises se torna ainda mais amplo quando se utiliza uma abordagem de série de tempo, como a que é implementada de forma discreta no presente estudo.

### 4.2 Genes diferencialmente expressos (DEG)

No intuito de selecionar genes candidatos para análises posteriores do processo de infecção de *Toxoplasma gondii*, utilizamos dois métodos distintos de análise de hibridações de Genechip, incorporando a avaliação de confiança estatística.

#### **4.2.1 Genes selecionados por Li e Wong**

Os genes previamente analisados pelo método de Li e Wong de análise de expressão foram submetidos à análise estatística pelo método SAM. Dessa análise, foram selecionados 1803 genes que apresentaram diferenças entre as cinco amostras estudadas, com um valor de FDR de 5%. Destes 1803 DEG, 265 apresentaram uma razão mínima de diferença de 75%, que foi o critério selecionado para a determinação de relevância biológica.

#### **4.2.2 Genes selecionados por gcRMA**

Os genes previamente analisados pelo método de gcRMA de análise de expressão foram submetidos à análise estatística pelo método SAM. Dessa análise, foram selecionados 1780 genes que apresentaram diferenças entre as cinco amostras estudadas, com um valor de FDR de 5%. Destes 1780 genes, 678 apresentaram uma razão mínima de diferença de 75%.

A seleção pelos critérios de FC de 1,75 e FDR de 5% foram empregados para os dois métodos a fim de selecionar genes candidatos extremamente confiáveis com relação a sua expressão diferencial, para serem usados em estudos comprobatórios posteriores.

Embora os dois métodos apresentem um número de genes diferencialmente expressos, com confiabilidade estatística, relativamente igual (1803 para Li-Wong e 1780 para gcRMA), há uma grande diferença quando incluímos um critério de FC visando selecionar genes com maior relevância biológica (265 para Li-Wong e 678 para gcRMA).

Essa discrepância é explicada pelo grau de sensibilidade e especificidade que esses métodos apresentam. Li-Wong apresenta maior sensibilidade (isto é, seus valores de expressão são mais próximos do valor real) e menor especificidade (que no caso da estatística de microarranjos, significa reprodutibilidade), enquanto que gcRMA é o contrário. Portanto, os resultados de Li-Wong serão mais variáveis (menos reprodutíveis) e por isso tendem a não serem selecionados pelos critérios estatísticos, quando há um grau de expressão diferencial importante (>75% de aumento ou diminuição); por outro lado, os genes que apresentam menor expressão diferencial tendem a serem considerados como constantes pelo gcRMA, e não são selecionados.

O resultado da análise por gcRMA foi utilizado para outras análises posteriores. A seleção desse método se deveu ao fato de produzir valores de expressão mais reprodutíveis, con-

forme descrito na literatura (IRIZARRY *et al.*, 2003), e por fornecer um número maior de genes diferencialmente expressos com relevância biológica.

Os outros critérios de seleção, a partir dos genes previamente analisados pelo método gcRMA foram os seguintes, mantendo-se o valor de FDR de 5%:

- **sem limite de FC:** 1780 DEG;
- **FC 1,5:** 678 DEG;
- **FC 2,0:** 459 DEG.

### ***4.2.3 Determinação de DEG comuns aos dois métodos***

Conforme descrito anteriormente, os métodos de Li-Wong e gcRMA diferiram em todas as etapas da análise de hibridações de Genechip, especialmente com relação ao uso das sondas MM. Essa parte é considerada como sendo a que tem a maior influência no resultado final, representando que os resultados obtidos sofrem influência grande da hibridação cruzada com mRNAs de outros genes.

Nessa etapa, nosso objetivo foi selecionar genes que possuíssem probabilidade extremamente alta de expressão diferencial, para que pudessem ser utilizados em experimentos com probatórios de PCR quantitativa e biologia celular, minimizando o investimento de tempo e dinheiro em achados que individualmente poderiam ser menos confiáveis. A lógica dessa análise se baseia no fato de que como a hibridação cruzada é o fenômeno que mais influencia na precisão dos dados de Genechip; ao selecionar genes modulados de forma idêntica por dois métodos extremamente divergentes no tratamento da hibridação cruzada, estaríamos identificando os genes cuja expressão diferencial fosse muito pouco influenciada por esse fator. Visando aumentar a estringência da análise, usamos o critério mínimo de expressão diferencial de 100% (e não 75%, conforme descrita acima).

A partir dos genes selecionados conforme descrito nos itens anteriores (265 por Li-Wong e 678 por gcRMA), foram selecionados 22 genes que passaram pelos critérios de 100% de expressão diferencial e padrão de expressão correlato entre os dois métodos.

#### **4.2.3.1 Genes diminuídos em 30 minutos**

Foram selecionados 2 genes diminuídos em 30 minutos de infecção.



#### 4.2.3.1.1 *Proteína de ligação ao cálcio s100 (s100g)*

Esse gene apresentou um perfil de expressão diminuída em 30 minutos (~3x) e em 4 horas (~2x). Conforme podemos ver no gráfico 4.1, a amostra que se apresenta diferente das demais é o controle de 4 horas. Portanto, uma possibilidade para explicar esse fenômeno é que a infecção bloqueie o aumento evidenciando nessa amostra, sendo que no controle 24 horas, os níveis de expressão são similares às amostras infectadas. Esse resultado peculiar é relativamente confiável, pois foi reproduzível nos dois controles 4 horas.

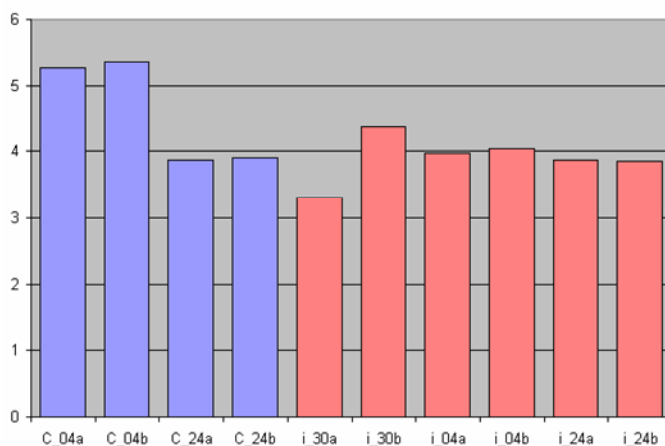


Gráfico 4.1. Expressão diferencial do gene *s100g*.

Gráfico da intensidade em base logarítmica 2 do nível de expressão (eixo Y), nas amostras estudadas.

Azul: controle 4h e 24h; Vermelho: infectado 30m, 4h e 24h  
a e b são replicatas experimentais

I30 é comparado a C04

Esse gene é geralmente citado com o nome de *calb3*. A proteína CALB3 é uma proteína vitamina D-dependente com sítios de interação para cálcio, da mesma família das proteínas cálcio ligantes como a calmodulina, parvalbumina, troponina C e outras proteínas S100, sendo encontrada em vários tecidos como intestino, placenta, útero, neurônios, retina e rins de mamíferos. A função principal desta proteína não é bem conhecida, podendo aumentar a absorção de  $\text{Ca}^{++}$  no citoplasma através do aumento do transporte ativo de  $\text{Ca}^{++}$  na membrana das células. As proteínas nCaBPs (proteínas ligantes a cálcio) podem contribuir na regulação sináptica nos neurônios prevenindo a liberação da neurotransmissão.

#### 4.2.3.1.2 *Complexo de tráfego de partículas protéicas 5 (trappc5)*

Esse gene apresentou um perfil de expressão diminuída em 30 minutos (~2x). Conforme podemos ver no gráfico 4.2, esse padrão é muito semelhante ao visto ao gene anterior, isto é, a

amostra divergente é a controle 4 horas. No entanto, os valores de expressão em infectado 4 e 24 horas foram mais variáveis, demonstrando que esse gene apresenta um perfil complexo de expressão diferencial no presente trabalho. De qualquer forma, a diminuição em 30 minutos é bem confiável e reproduzível, além de ser equivalente nos dois métodos de análise de dados do Genechip (critério de seleção, mas dado não mostrado).

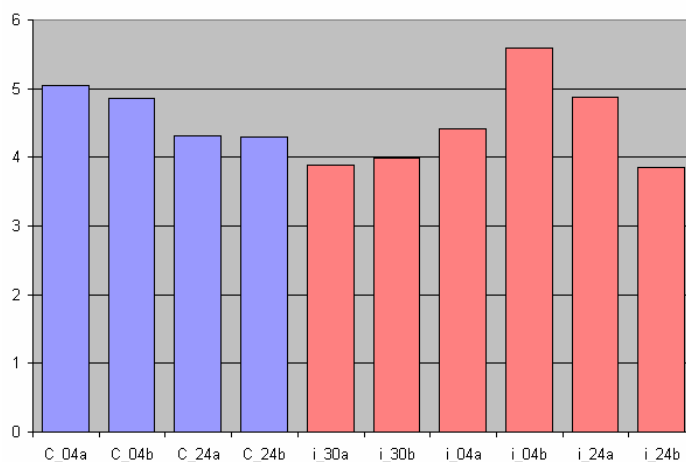


Gráfico 4.2. Expressão diferencial do gene *trappc5*.

Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A proteína Trappc5p está localizada exclusivamente na membrana do Golgi, sendo um componente do complexo chamado TRAPP. Ela atua na transição entre o retículo endoplasmático e o Complexo de Golgi, juntamente com as proteínas SNAREs. A localização de TRAPP no Golgi pode ser importante no ancoramento vesicular na membrana. O transporte vesicular agrega um complexo múltiplo de interações entre componentes como, por exemplo o complexo TRAPP, Rabs, SNAPAP e SNAREs. O holo complexo é chamado TRAPP II, a qual consiste dos componentes Bet3p, Bet5p, Trs20p, Trs23p, Trs31p, Trs33p e Trs85p/Gsg1p que é chamado TRAPP I (SACHER *et al.*, 1998; SACHER *et al.*, 2001). O complexo TRAPP mostrou agir como GEF para Ypt1 e Ypt31/32 GTPases *in vitro* e *in vivo*. (JONES *et al.*, 2000). A Ypt1 GTPase é necessária no cis-Golgi para a fusão das vesículas derivadas do retículo endoplasmático (SEGEV, 1991; CAO & BARLOWE, 2000) e função da Ypt31/32 GTPase é essencial para a formação de vesículas trans-Golgi (JEDD *et al.*, 1997).

#### 4.2.3.2 Genes diminuídos a partir de 30 minutos de infecção

Foi selecionado 1 gene diminuído a partir de 30 minutos

#### 4.2.3.2.1 Homólogo a *snail 1* (*snail*)

No gráfico 4.3, podemos verificar que esse gene apresenta um padrão consistente de diminuição já em 30 minutos e 4 horas (~4x), sendo que em 24 horas a diminuição chegou a 16x. É possível também evidenciar que, em certas condições experimentais, a expressão do gene também diminuiu em uma das amostras de controle. No entanto, o perfil das seis amostras infectadas, comparadas com as outras três amostras controle reflete claramente a diminuição da expressão durante a infecção. O motivo da diminuição da expressão em C24a é desconhecido, mas pode ser investigada ao se verificar outros genes que apresentam um perfil idêntico de expressão, através do uso de um agrupamento hierárquico.

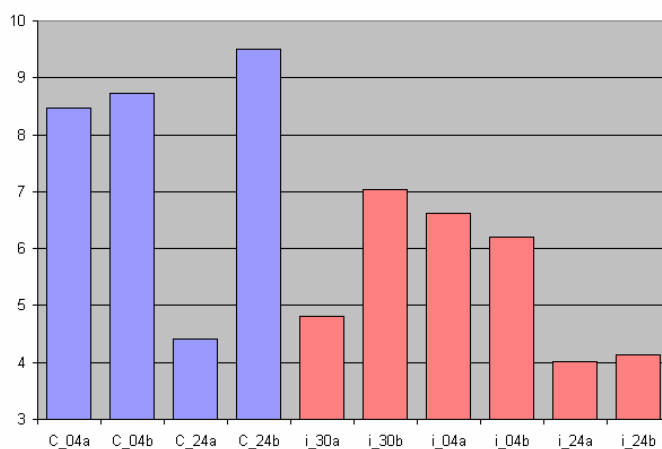


Gráfico 4.3. Expressão diferencial do gene *snail*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A proteína SNAIL é membro de uma superfamília que contém motivos repressores transcricionais do tipo *zinc-finger*, tendo um papel crítico no estabelecimento do plano do corpo de vertebrado, com Snail1 promovendo a transição mesenquimal-epitelial durante o desenvolvimento. Camundongos que não produzem Snail funcionais exibem defeitos na gastrulação levando a letalidade (MURRAY *et. al.*, 2006). SNAIL é encontrado na placenta, tecido cardíaco, cérebro, rim, fígado e tecido muscular esquelético. Muitas proteínas *zinc-finger* da família das Snail são essenciais na formação do mesoderma durante a gastrulação e desenvolvimento da crista neural e derivados (PAZNEKAS *et. al.*, 1999). SNAIL também regula o ciclo celular e confere resistência contra a morte celular induzindo a retirada de fatores e sinais pro-apoptóticos. Essa resistência à morte celular confere uma vantagem seletiva das células embrionárias a migrarem e colonizarem regiões distantes (VEGA, *et. al.*, 2004).

### 4.2.3.3 Genes diminuídos em 24 horas de infecção

Foram selecionados 3 genes diminuídos em 24 horas de infecção

#### 4.2.3.3.1 Membro 5 da família do domínio *yip1* (*yipf5*)

O gene *yipf5* é avaliado por dois *ProbeSets* distintos, cujos perfis de expressão muito similares podem ser vistos no gráfico 4.4.

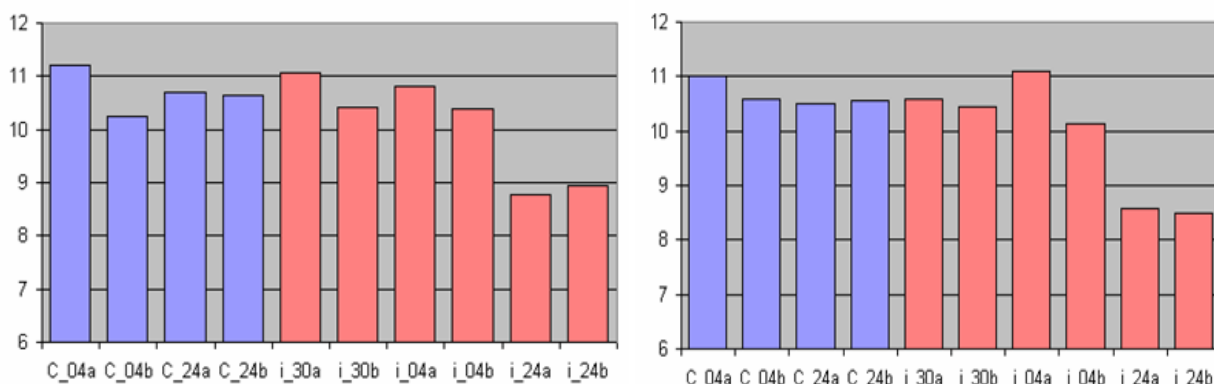


Gráfico 4.4. Expressão diferencial do gene *yipf5*

Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

É possível verificar que esse gene apresenta uma diminuição de aproximadamente 3 vezes na infecção em 24 horas, sendo que em fases anteriores do processo infectivo, seus níveis são equivalentes aos das amostras controles.

Em humano, YIPF5 ou SMAP-5 é membro da família de proteínas transmembrana localizada no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (RE), estando envolvidas no tráfico intracelular. Análises filogenéticas revelaram que SMAP-5 é membro da família dos fatores de interação com as Rab GTPases. *Smep-5* é expresso praticamente em todos os tipos de tecido, sendo que altos níveis de expressão foram encontrados em células lisas de músculo coronário na qual a expressão foi induzida por TGF- $\beta$ 1, assim indicando que esta proteína pode ter um papel importante na inflamação (STOLLE *et. al.*, 2005). A proteína SMAP-5 modula o transporte RE-Golgi mediados por COPII. Esta proteína está localizada em estruturas vesiculares concentradas na região perinuclear. SMAP-5 se colocaliza com Sec31A e Sec13 (componentes de COPII) (TANG *et. al.*, 2001).

#### 4.2.3.3.2 *ATPase transportadora de H<sup>+</sup>, lisossomal, V1 subunidade D1 (atp6v1d1)*

No gráfico 4.5 é possível verificar que esse gene apresenta uma diminuição de aproximadamente 2 vezes na infecção em 24 horas, sendo que em fases anteriores do processo infectivo, seus níveis são equivalentes aos das amostras controles.

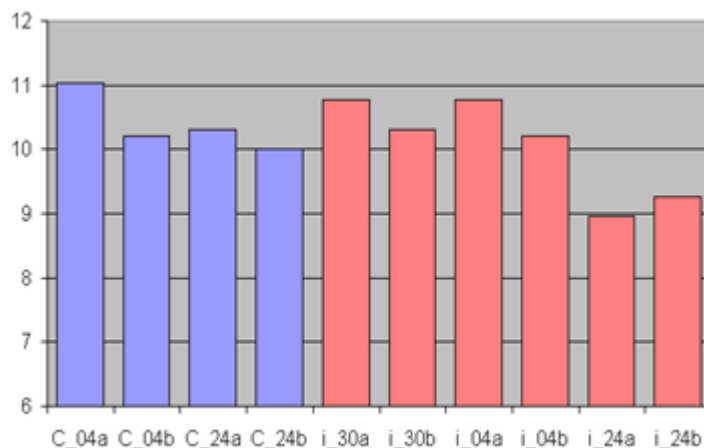


Gráfico 4.5. Expressão diferencial do gene *atp6v1d*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

#### 4.2.3.3.3 *ATPase transportadora de H<sup>+</sup>, lisossomal, V1 subunidade B2 (atp6v1b2)*

No gráfico 4.6 é possível verificar que esse gene apresenta uma diminuição de aproximadamente 2 vezes na infecção em 24 horas, sendo que em fases anteriores do processo infectivo, seus níveis são equivalentes aos das amostras controles.

O padrão dos genes *atp6v1d1* e *atp6v1b2* são muito similares. Estes genes compõem uma ATPase vacuolar, uma multisubunidade da enzima que medeia a acidificação de organelas intracelulares eucarióticas. As ATPases-H(+) vacuolares acidificam endossomos, lisossomos, Golgi e vesículas secretórias, transportando prótons através da membrana dentro do espaço extracelular. Elas são formadas através de várias subunidades e utilizam a hidrólise do ATP para mover prótons através da membrana. Essas bombas são envolvidas em várias funções celulares, incluindo regulação do pH citosólico, transporte vesicular, endocitose, secreção e apoptose (KENNELL *et. al.*, 2001).

#### 4.2.3.4 Gene Diminuídos em 4 Horas e 24 Horas de Infecção

Foram selecionados 3 genes diminuídos em 4 horas e 24 horas

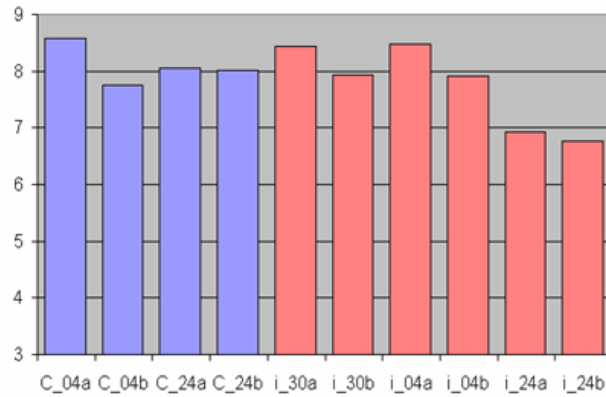


Gráfico 4.6. Expressão diferencial do gene *atp6v1b2*

Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

#### 4.2.3.4.1 Proteína associada à Snap (*snapap*)

No gráfico 4.7 verificamos que houve uma diminuição de 2 vezes no nível do mRNA codificante dessa proteína durante o processo infeccioso.

SNAPAP é um componente do complexo SNARE de proteínas que são importantes no acoplamento e na fusão de vesículas sinápticas. Além disso, SNAPAP é o componente do complexo protéico BLOC1 que é expresso na maioria dos tipos celulares. Esse complexo é necessário para a biogênese normal das organelas especializadas do sistema endossomal-lisossomal, como melanossomos e grânulos densos plaquetários (STARCEVIC & DELL'ANGELICA, 2004).

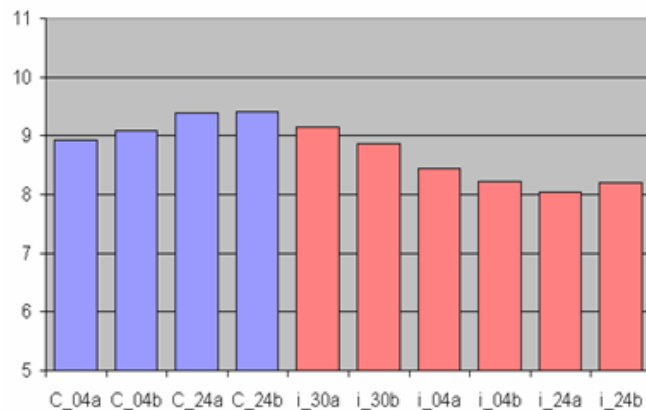


Gráfico 4.7. Expressão diferencial do gene *snapap*

Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

#### 4.2.3.4.2 *Angiomotina like 2 (amotl2)*

No gráfico 4.8 verificamos que houve uma diminuição da expressão desse gene de 3 vezes em 4 horas e de aproximadamente 11 vezes em 24 horas de infecção (variando entre 8 e 22 vezes).

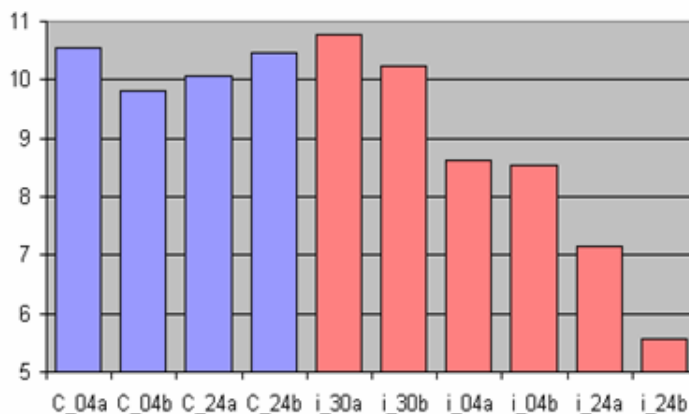


Gráfico 4.8. Expressão diferencial do gene *amotl2*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A angiomotina foi previamente identificada através da técnica duplo-híbrido como ligante da angiostatina, um inibidor da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Foram encontradas duas seqüências protéicas em seres humanos, cujos genes codificadores foram chamados de angiomotina-like 1 e 2. A análise das seqüências indicou serem formadas por motivos *coiled-coil* e domínios *PDZ-binding* na região carboxi-terminal (BRATT *et. al.*, 2002). Os domínios PDZ são encontrados em diversas proteínas sinalizadoras em bactérias, fungos, plantas, insetos e vertebrados. Esse domínio pode se ligar a outras seqüências carboxi-terminais ou regiões peptídicas internas de proteínas. Proteínas com domínios PDZ são frequentemente associadas com a membrana plasmática em regiões contendo altas concentrações de 4,5 bifosfato fosfatidilinositol (PIP2).

Muitas proteínas que contem esse domínio PDZ são dinamicamente reguladas e também estão envolvidas no tráfico de interação de proteínas dentro da célula (SHENG *et. al.*, 2001).

#### 4.2.3.4.3 *Proteína transmembrana 43 (tmem43)*

No gráfico 4.9 verificamos que houve uma diminuição da expressão desse gene de 2 vezes em 4 horas e de aproximadamente 3 vezes em 24 horas de infecção.

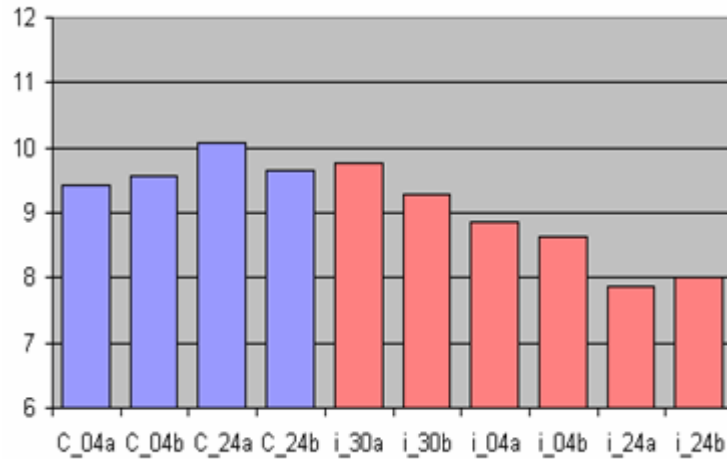


Gráfico 4.9. Expressão diferencial do gene *tmem43*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

Não foram encontrados trabalhos referentes a esta proteína.

#### 4.2.3.5 Genes Aumentados em 30 Minutos de Infecção

Foram selecionados 6 genes aumentados em 30 minutos de infecção

##### 4.2.3.5.1 Proteína zinc finger 36 (*zfp36*)

No gráfico 4.10 verificamos que o nível de expressão desse gene aumenta de forma clara em 30 minutos de infecção, aumentando cerca de 16 vezes. Em 4 horas, o aumento é menos perceptível (~2 vezes em somente uma das réplicas), estando igual ao controle em 24 horas.

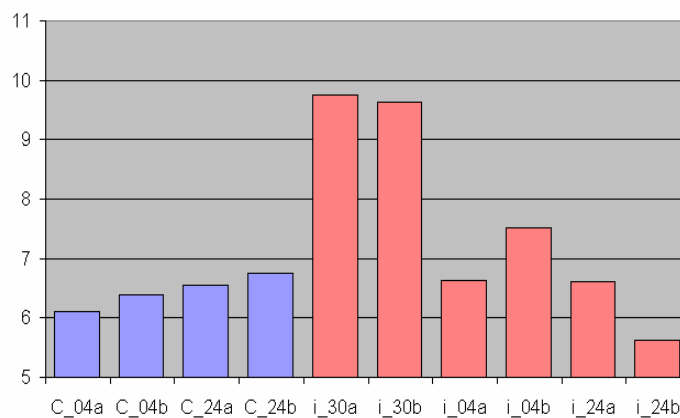


Gráfico 4.10. Expressão diferencial do gene *zfp36*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico



A proteína tristetraprolina de camundongo (TTP), também chamada de ZFP36, é uma proteína de ~33KDa basicamente rica em prolina que contém três repetições de uma sequência de quatro prolinas constitutivas. São localizadas no núcleo da célula e contém uma estrutura *zinc-finger* não usual. A expressão aumentada ou diminuída da tristetraprolina consequentemente aumentava ou diminuía a expressão de iNOS devido a modulação na estabilidade do RNAm-iNOS. Experimentos mostraram a interação da tristetraprolina com um proteína reguladora de splicing (KSRP), que é conhecida por recrutar mRNAs que apresentavam elementos ricos em AU para a degradação. A tristetraprolina não se liga diretamente a esses mRNAs, mas sim com a proteína KSRP do complexo exossomo estabilizando os iNOS-mRNAs (FECHIR *et. al.*, 2005). A IL-4 induz a expressão da tristetraprolina nos mastócitos e, desta forma, há uma regulação na produção excessiva do TNF- $\alpha$ . Muitas doenças de natureza inflamatória estão relacionadas com a produção exagerada de TNF- $\alpha$ , tais como a artrite reumatóide e as várias doenças intestinais inflamatórias idiopáticas (SUZUKI *et al.* 2003).

#### 4.2.3.5.2 *Oncogene B osteossarcoma FBJ (fosb)*

No gráfico 4.11 verificamos que o nível de expressão desse gene aumenta de forma muito impressionante em 30 minutos de infecção (~30 vezes). Em 4 horas, há uma maior variação do nível de expressão, mas em 24 horas os níveis já se encontram estabilizados. É interessante ressaltar que o valor de expressão desse gene nas amostras controle (~2,7) é compatível com a ausência de hibridação, isto é, o mRNA não está sendo expresso nessas células.

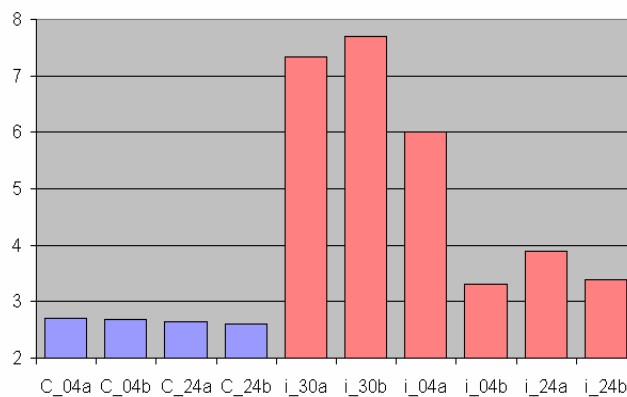


Gráfico 4.11. Expressão diferencial do gene *fosb*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

#### 4.2.3.5.3 *Oncogene do osteosarcoma FBJ (fos)*

No gráfico 4.12 verificamos que o nível de expressão desse gene aumenta de forma importante em 30 minutos de infecção (~20 vezes), muito semelhante a FosB. Em 4 horas, ainda há um aumento perceptível, de aproximadamente 12 vezes, voltando os níveis a valores relativamente semelhantes em 24 horas. Diferentemente do FosB, que apresentava valores em controles próximo a zero, esse gene apresenta valores de expressão basal no controle compatível com a presença do mRNA na célula, antes mesmo do processo infeccioso.

A família de genes *fos* consiste de 4 membros: *fos*, *fosb*, *fosl1* e *fosl2*. Estes genes codificam proteínas com motivos zíper de leucina podendo dimerizar com proteínas da família JUN, assim, formando o complexo AP-1, um fator transcricional. Essas proteínas são reguladores da diferenciação, transformação e proliferação celular, tendendo a formar heterodímeros ou homodímeros e, dessa maneira, apresentam afinidade de ligação ao DNA, provocando a ativação de seus genes alvos. Após a formação do dímero, através de um zíper de leucina, o complexo (fator de transcrição funcional ou proteína-ativadora 1) AP-1 se ligará a uma seqüência gênica específica, o sítio AP-1, reconhecido como essencial para a transcrição basal ou ativada de vários genes. Simultaneamente, ao interagir com outros fatores de transcrição, o heterodímero das proteínas FOS e JUN formam uma ligação entre sistemas de segundos mensageiros independentes. Essas proteínas e outros ITFs atuam, portanto, como “terceiros mensageiros” nucleares, ligando eventos mediados pelos segundos mensageiros a alterações subseqüentes na expressão gênica. Alguns estudos sugerem que a indução da expressão da proteína Fos depende da elevação dos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$ , que decorrem de influxo desse íon através de canais de  $Ca^{++}$ , sejam eles operados por receptor glutamatérgico, tipo NMDA (N-Methyl-D-Aspartato), ou através de canais de  $Ca^{++}$  voltagem dependentes (VSCC), após ativação de receptores por aminoácidos excitatórios, tipo não-NMDA. Outras evidências sugerem que a expressão da proteína Fos depende da interação entre o  $Ca^{++}$  que adentra o meio intracelular através de canais operados por receptor tipo-NMDA e a estimulação de segundos mensageiros, como diacilglicerol (DAG), que são ligados a receptores metabotrópicos e que são capazes de ativar a proteína quinase (ERKs) (PRADO & DEL BEL, 1998).

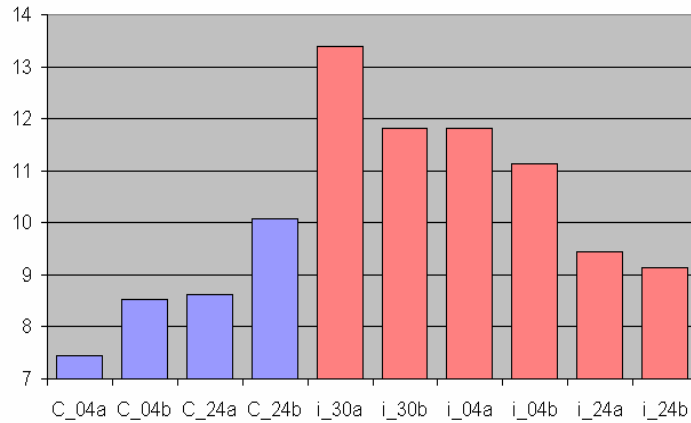


Gráfico 4.12. Expressão diferencial do gene *fos*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A expressão dos genes da família *fos* é estimulada por fatores de crescimento induzindo células quiescentes a entrarem no ciclo celular. As proteínas C-FOS e FOSB induzem diretamente a transcrição da ciclina D1 podendo ter essas proteínas, um papel crítico na progressão do ciclo celular juntamente com a estimulação por soro (BROWN *et. al.*, 1998). C-FOS tem atividade oncogênica e é frequentemente expressa em grande quantidade em células tumorais (MILDELANGOSCH *et. al.*, 2005).

#### 4.2.3.5.4 Gene de translocação de células B 2, antiproliferativo (*btg2*)

No gráfico 4.13 podemos verificar que o nível de expressão desse gene aumenta de forma clara em 30 minutos de infecção, aumentando de 4 a 16 vezes nas diferentes réplicas experimentais, sendo o aumento de aproximadamente 4 vezes mais confiável, pelo padrão das demais amostras. Após o aumento em 30 minutos, os níveis retornam aos valores usuais.

Esse gene codifica uma proteína membro da família BTG/Tob. Esta família apresenta estruturalmente proteínas relacionadas a processos antiproliferativos, estando envolvida na regulação da transição da fase G1/S no ciclo celular. A inativação do gene *btg2* em células embrionárias conduz a um bloqueio no reparo do DNA na fase G2/M e morte das células.

O gene *btg2* foi isolado de camundongo por BRADBURY *et al.* (1991) como sendo um gene de resposta imediata (*immediate early gene*), classe à qual pertencem os oncogenes *fos* e *jun*,

sendo induzido pelo fator de crescimento de neurônios (NGF) em células derivadas de feocromocitoma.

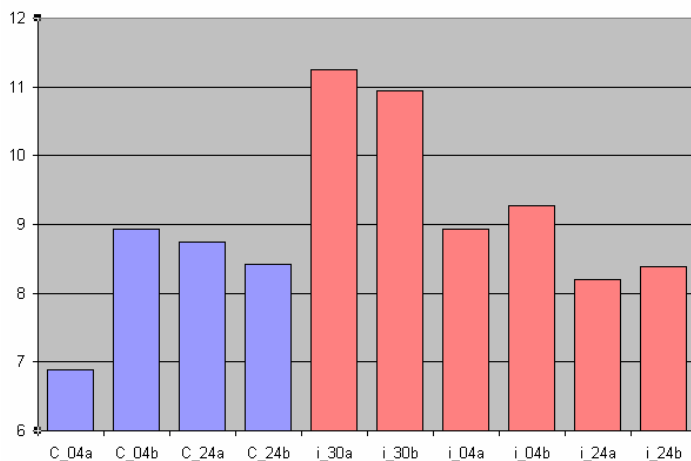


Gráfico 4.13. Expressão diferencial do gene *btg2*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

As proteínas BTGs podem funcionar como pontes entre os receptores nucleares associados com os componentes co-ativadores ou co-repressores da maquinaria da transcrição. BTG1 e BTG2 podem ser trans-ativados por outros membros da família de receptores nucleares, e indicam que BTG1 e BTG2 modulam também a atividade do transcrição do receptor- $\alpha$  do hormônio da tireóide (PREVOT *et. al.*, 2001).

O gene *btg2* é um dos cinco membros da família de genes antiproliferativos. BTG2 interage fisicamente com a proteína Caf1, um elemento do complexo geral de transcrição e com PRMY1, uma proteína arginina N-metil transferase demonstrando sua participação como modulador da cascata de transdução de sinal intracelular (DURIEZ *et. al.*, 2004).

As proteínas da família BTG/Tob são poliubiquitinadas e degradadas pelo proteossoma 26S, como já foi descrito para várias proteínas oncogênicas ou supressoras tumorais de vida curta.

BTG1 e BTG2 interagem com uma proteína-arginina-N-metiltransferase (PRMT1) e regulam positivamente sua atividade, o que é importante porque esta enzima catalisa a maioria das reações de modificações pós-transcricionais em proteínas, além de contribuir para o processamento do RNA, para o transporte de proteína e para a regulação da transcrição. A expressão

aumentada de BTG1 e BTG2 durante processos de diferenciação pode estar estimulando a atividade de PRMT1 metil-transferase, caracterizando uma nova via de transdução (BERTHET *et al*, 2002).

#### 4.2.3.5.5 Fator regulatório de interferon 1 (*irf1*)

No gráfico 4.14 podemos verificar que o nível de expressão desse gene aumenta de forma clara em 30 minutos de infecção (~5 vezes). No entanto, esse gene, apresentou um aumento nas amostras controle 24 horas, embora esse aumento não tenha sido verificado em infectados 4 e 24 horas.

O gene *irf1* codifica uma proteína membro da família de fatores regulatórios de transcrição de interferons, servindo como ativador da transcrição dos interferons alfa e beta e estando envolvido na regulação da apoptose e supressão de tumor. Muitos destes genes são fatores transcricionais que podem seletivamente modular grupos de genes dependendo do tipo celular ou a natureza do estímulo celular, assim como desencadear os mecanismos de defesas do hospedeiro contra infecções (HARADA *et. al.*, 1998). A proteína IRF1 é uma fator transcricional com propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas mediando o processo apoptótico induzido por PPAR- $\gamma$  em células musculares lisas vasculares (VSMCs) (LIN *et. al.*, 2004).

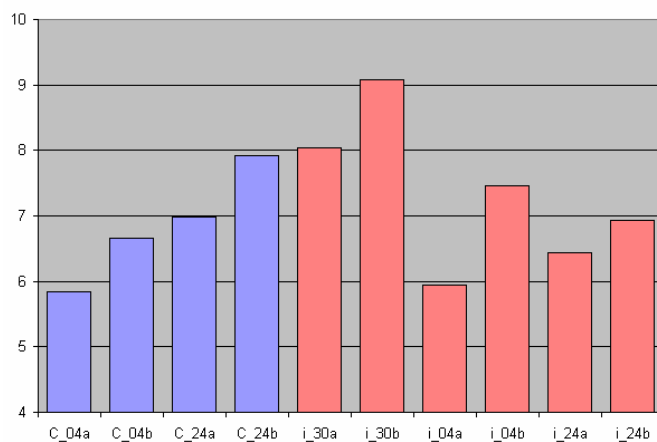


Gráfico 4.14. Expressão diferencial do gene *irf1*

Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

#### 4.2.3.5.6 Homólogo a Dnaj, subfamília B, membro 1 (*dnajb1*)

No gráfico 4.15 podemos verificar que o nível de expressão desse gene aumenta de forma clara em 30 minutos de infecção (~2 vezes), apresentando uma diminuição, tanto em controles e infectados, em 24 horas.

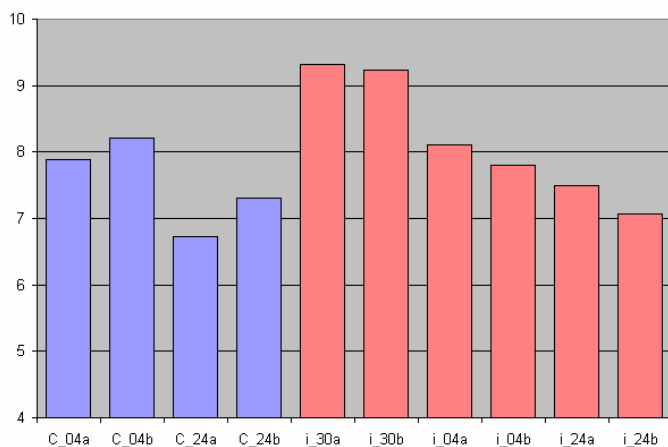


Gráfico 4.15. Expressão diferencial do gene *dnajb1*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A proteína DNAJ tem função de chaperona molecular juntamente com DNAK (HSPA1A) e GRPE, sendo envolvidos na conjugação e desmontagem de complexos, remodelagem, renaturação de proteínas desnaturadas, prevenção de agregados e exportagem de proteína. Essa proteína foi identificada como fator de proteção em doenças neurodegenerativas, causadas pela expansão de tratos de poliglutamina, através da ligação às mesmas (CHAN *et al.*, 2000).

#### 4.2.3.6 Genes aumentados em 30 Minutos e 4 Horas de Infecção

Foi selecionado 1 gene aumentado em 30 minutos e 4 horas de infecção

##### 4.2.3.6.1 Proteína de parada do crescimento induzida por dano ao DNA 45 beta(*gadd45b*)

No gráfico 4.16 podemos verificar que o nível de expressão desse gene aumenta cerca de 2 vezes em 30 minutos de infecção, e 4 vezes em 4 horas. Em 24 horas, ele apresenta aumento também no controle, porém em média está mais aumentado em infectados, mesmo em 24 horas.

Este gene é altamente homólogo ao humano com função de controle negativo do crescimento e apoptose. *Gadd45* é expresso em vários tecidos como fígado, músculo esquelético, rim, pâncreas, timo, prostata e leucócitos (SAKAUE *et al.*, 1999). *GADD45α*, *GADD45β* e *GADD45γ*

constituem uma família de pequenas proteínas ácidas nucleares conservadas, implicadas na diferenciação, supressão do crescimento e apoptose. Elas interagem com o complexo Cdk1/CiclinaB1. As proteínas GADD45 inibem as quinases cdc2/ciclinaB1 e bloqueia o ciclo celular na fase G2/M. Estas proteínas cooperam na ativação dos *checkpoints* nas fases S e G2/M. (VAIRAPANDI *et. al.*, 2002).

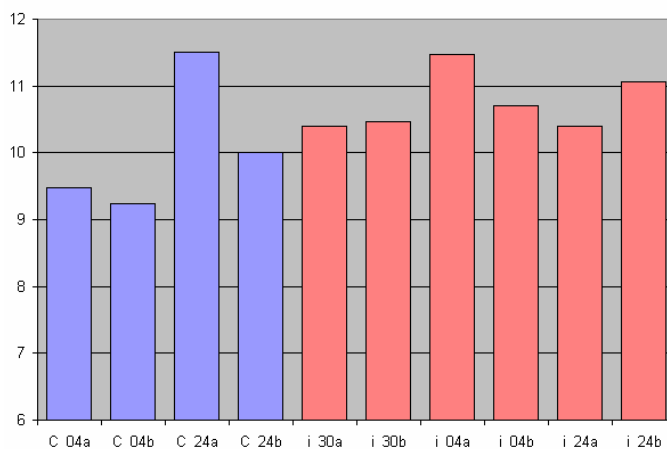


Gráfico 4.16. Expressão diferencial do gene *gadd45b*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A sinalização de NF-kappaB envolve a indução da expressão de *gadd45beta*, a qual tem a função de proteger as células contra lesões no DNA em condições de estresse. GADD45 $\alpha/\beta$  induzem o aumento das caspases 3/7 e anexinaV, participando também do processo apoptótico induzido por TGF-beta ativando p38. GADD45 $\alpha/\beta$  são inibidores da cdc2/cyclinB1, proteínas responsável pelo *checkpoint* na fase S e G2/M no ciclo celular. O fator transcricional NF-kappaB controla a sobrevivência celular agindo no processo antiapoptótico. NF-kappaB reprime a cascata JNK e esta supressão envolve a expressão aumentada de *gadd45b*. NF-kappaB regula a expressão de *gadd45b* proporcionando um mecanismo de controle de apoptose por fator transcricional. (JIN *et. al.*, 2002).

GADD45 $\alpha$  e GADD45 $\beta$  se ligam ao domínio N-terminal da proteína MTK1. GADD45 $\alpha$  e GADD45 $\beta$  ativam MTK1 quinase mediando a ativação de *p38* e *jnk* em resposta ao estresse (TAKAKAWA *et. al.*, 1998).

#### 4.2.3.7 Genes Aumentados em 24 Horas de Infecção

Foram selecionados 2 genes aumentados em 24 horas de infecção.

#### 4.2.3.7.1 *Beta actina (actb)*

No gráfico 4.17 podemos verificar que o nível de expressão desse gene aumenta, de forma clara, cerca de 8 vezes em 24 horas de infecção. Há um aumento também em 4 horas, de aproximadamente 4 vezes, embora o controle varie. Um dos experimentos mostrou um aumento claro em 30 minutos. Esses dados corroboram a idéia de que beta actina está aumentada durante a infecção, mas há variações temporais no estabelecimento inicial desse aumento. Esse gene também é modulado no controle, entre 4 e 24 horas (4 vezes) mostrando a adaptação da célula controle à cultura, mas a infecção intensifica esse aumento.

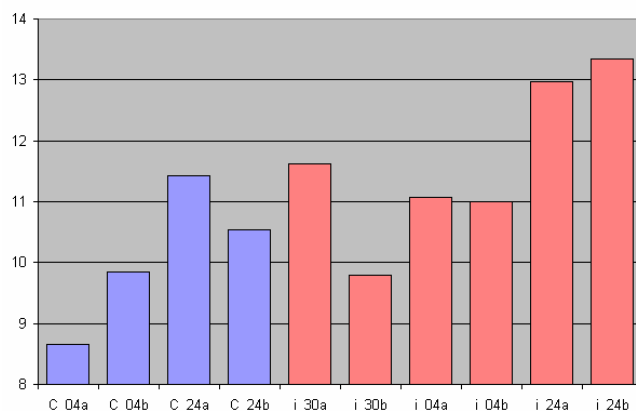


Gráfico 4.17. Expressão diferencial do gene *actb*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A beta-actina é uma das seis isoformas de actina identificadas, sendo uma das duas actinas de citoesqueleto. As actinas são proteínas altamente conservadas e são envolvidas na motilidade, estrutura e integridade celular. A actina alfa é o maior constituinte do processo de contração. As isoformas ACTB e ACTG foram encontradas associadas ao Golgi e vesículas recobertas com a proteína COPI podendo estar envolvida na formação e no transporte de vesículas derivadas do Golgi (VALDERRAMA *et. al.*, 2000).

#### 4.2.3.7.2 *Uridina fosforilase 1 (upp1)*

No gráfico 4.18 podemos verificar o nível de expressão desse gene. Embora haja uma grande variabilidade da expressão do gene em algumas amostras (C04, I30, I04), o padrão de aumento, principalmente em 24 horas é muito claro, alcançando cerca de 25 vezes.



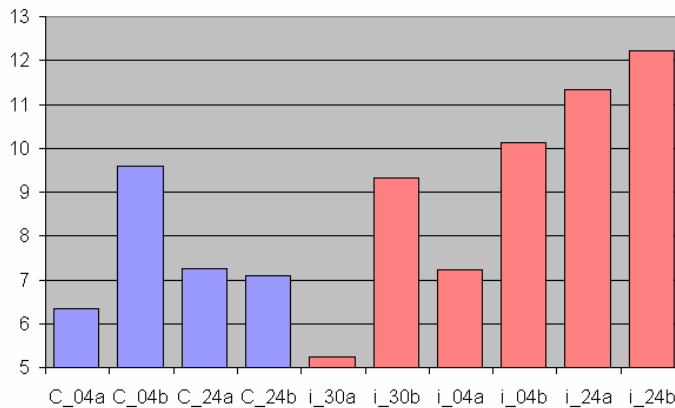


Gráfico 4.18. Expressão diferencial do gene *upp1*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

A uridina fosforilase (UPase) catalisa reversivelmente a fosforilação da uracil uridina. O nível de expressão e atividade enzimática da UPase foram encontradas como sendo altas em tumores sólidos humanos em relação aos tecidos normais. São conhecidos dois tipos de fosforilases de nucleosídeo de pirimidinas, uridina fosforilase e timidina fosforilase. Essas fosforilases podem adicionar ribose ou deoxiribose em bases pirimídicas formando nucleosídeos que podem ser incorporados dentro do RNA ou DNA.

Outros trabalhos mostram que a expressão do gene da uridina fosforilase em células tumorais como sendo aumentados quando as células eram tratadas com vitamina D3 e citocinas inflamatórias: TNF- $\alpha$ , interleucina-1 e interferon- $\gamma$  (CAO *et. al.*, 2004).

#### 4.2.3.8 Genes aumentados a partir de 30 minutos de infecção

Foram selecionados 4 genes aumentados a partir de 30 minutos de infecção

##### 4.2.3.8.1 Fator de ativação da transcrição 3 (*atf3*)

No gráfico 4.19 podemos verificar o nível de expressão desse gene. O aumento é forte, cerca de 8 vezes, embora haja um controle que apresentou um valor mais alto de expressão (C04a), embora abaixo dos valores avaliados para as amostras infectadas.

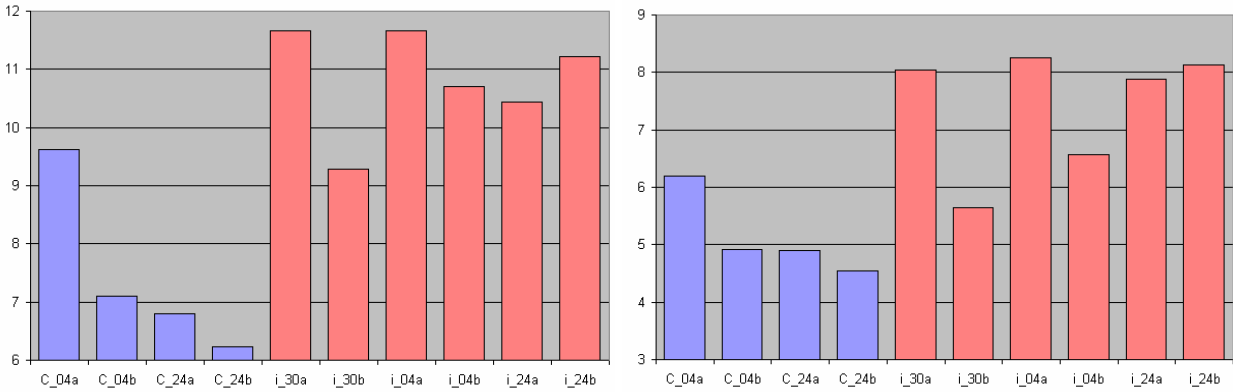


Gráfico 4.19. Expressão diferencial do gene *atf3*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

O ATF3 é membro das proteínas ativadoras da transcrição com massa molecular de 22kD. O gene *atf3* é rapidamente induzido em células expostas ao estresse, protegendo as células da apoptose induzida por TNF- $\alpha$ . Em células que tem expressão aumentada de *atf3*, o gene *p53* tem sua transcrição diminuída. ATF3 pode funcionar como um fator de sobrevivência da célula durante a inflamação (KAWAUCHI *et. al.*, 2002). Nos nossos dados, *p53* está diminuído.

Foram identificados três sítios de ligação no promotor do gene *atf3* para o fator transcripcional *egr-1* (veja item abaixo). A expressão aumentada de *egr-1* induz o aumento da expressão de *atf3*. Utilizando a técnica de RNAs de interferência, BOTTONE *et. al.*, (2005) demonstraram que o bloqueio de *egr-1* alterava a expressão de *atf3*.

#### 4.2.3.8.2 Gene de resposta precoce ao crescimento 1 (*egr1*)

No gráfico 4.20 podemos verificar o nível de expressão do gene *egr1*. O aumento é forte, no mínimo 8 vezes, embora haja uma grande variação no controle. A quantificação nas amostras infectadas é menos variável, indicativo da maior confiabilidade desse aumento.

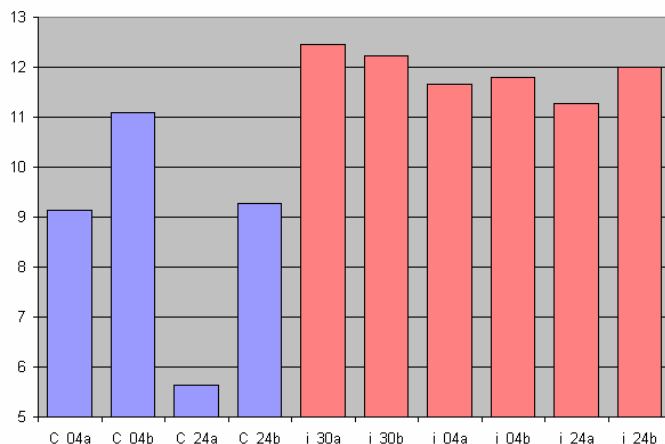


Gráfico 4.20. Expressão diferencial do gene *egr1*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

O gene de resposta precoce ao crescimento (*early growth response 1*, *egr1*, também conhecido como *ngfi-a*), juntamente com *egr2*, *egr3* e *egr4*, formam uma família de fatores de transcrição que apresenta homologia com o produto do gene supressor tumoral de Wilms, WT-1.

Os membros da família EGR regulam a transcrição através do reconhecimento de uma sequência consenso rica em GC (5'-GCGTGGGGCG-3'), que está presente em regiões regulatórias de algumas moléculas, incluindo o IGFII, PDGF A e B, fator tecidual e TGF- $\beta$ 1. No entanto, níveis elevados de *egr1* não significam necessariamente uma maior atividade transcricional *in vivo* devido à presença de uma família de moléculas co-repressoras, NAB-1 e NAB-2 (proteínas ligantes de NGF1-A 1 e 2), que interagem fisicamente com as proteínas EGR e influenciam em sua atividade.

Outros genes relacionados a tumores agressivos de próstata são regulados por EGR1, como TGF- $\beta$  e *insulin-like growth factor II* (fator de crescimento semelhante à insulina). Estas observações sugerem fortemente que o EGR1 tem função na progressão tumoral, apesar de sua conhecida função de supressor tumoral em outros tipos de câncer. Em alguns tumores, como o de mama, fibrossarcoma e o glioblastoma, *egr1* é descrito como gene supressor tumoral (KRONES-HERZIG *et al*, 2003). Recentemente, foi descrito um novo gene-alvo de *egr-1*, *toe1*, que é um inibidor do crescimento celular que altera o ciclo celular através da indução de *p21*.

#### 4.2.3.8.3 Gene de resposta precoce ao crescimento 2 (*Egr2*)

No gráfico 4.21 podemos verificar o nível de expressão desse gene. O aumento é forte, no mínimo 8 vezes. Ocorre uma diminuição durante o processo de diferenciação da célula controle, de aproximadamente 8 vezes, que não é acompanhada de forma proporcional pela amostra infectado 24 horas, levando a caracterização de um aumento de aproximadamente 32 vezes nessa fase da infecção.

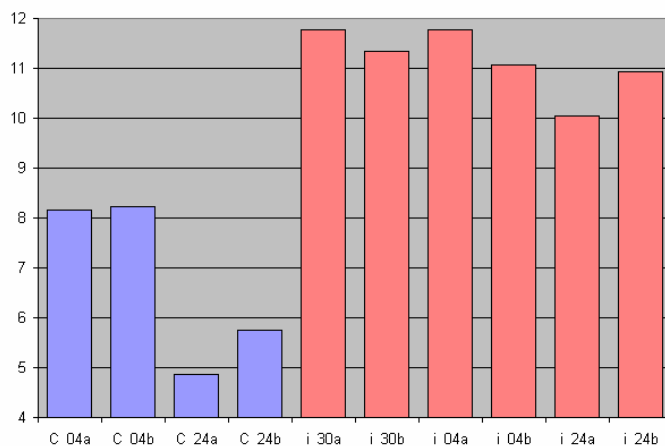


Gráfico 4.21. Expressão diferencial do gene *egr2*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

EGR2 é proteína que age como fator transcricional como EGR1, atribuindo sua função para o crescimento e proliferação celular e apoptose. Em células de Schwann, EGR2 regula a expressão de genes importante no processo de mielinização, incluindo genes que codificam mielinas e enzimas que participam da síntese normal de lipídeos (NAGARAJAN *et al.*, 2001).

#### 4.2.3.8.4 Gene de resposta imediata precoce 2 (*ier2*)

No gráfico 4.22 podemos verificar o nível de expressão desse gene. O aumento é de 2 a 3 vezes, sendo mais evidente em 30 minutos e 4 horas. Esse gene é uma proteína induzida por fator de crescimento, sendo estimulada por EGF e TNF-alfa. CHUNG *et al.* (2000) evidenciaram a expressão desse gene em fibroblastos induzidos a entrar em morte celular.

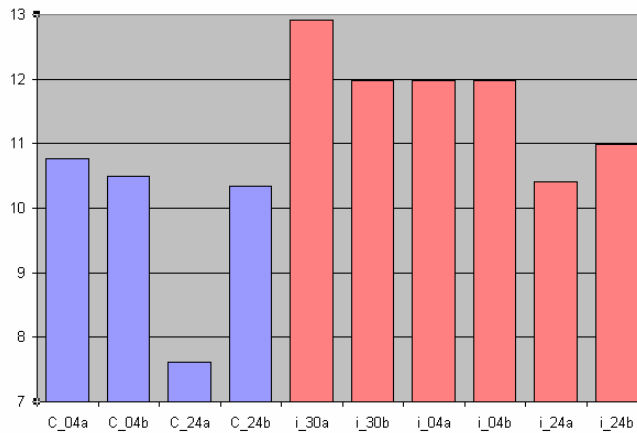


Gráfico 4.22. Expressão diferencial do gene *ier2*  
Ver gráfico 4.1 para explicação do gráfico

### 4.3 Organização dos DEG por agrupamento hierárquico

A análise de agrupamento é uma ferramenta importante no contexto de análise de genômica funcional, para organizar os padrões de expressão gênica correlatos em grupos distintos, permitindo ao pesquisador identificar padrões mais amplos, que em uma análise gene a gene, conforme a feita nos itens anteriores, não é possível. Essa mesma técnica pode ser utilizada para caracterizar funcionalmente genes desconhecidos que se agrupam a genes cuja função é conhecida. No entanto, essa utilização da técnica de agrupamento não foi utilizada no presente trabalho, pois seu objetivo é caracterizar os padrões gênicos presentes no processo de infecção por *Toxoplasma gondii*, e não a caracterização funcional de genes murinos.

A partir da organização de genes com perfis de expressão correlatos, é possível utilizar ferramentas de classificação gênica mais globais, visando identificar funções enriquecidas dentro dos grupos. Nesse sentido, a partir dos dados obtidos pelo método gcRMA, foi possível agrupar os genes, que no decorrer da infecção, apresentam perfis de expressão similares. Essa seleção de genes foi utilizada para análise posterior por termos GO. No gráfico 4.23 temos uma visualização geral dos padrões de co-expressão dos 678 DEG selecionados anteriormente, cujos grupos foram utilizados para a análise por GO realizada nos tópicos subseqüentes.

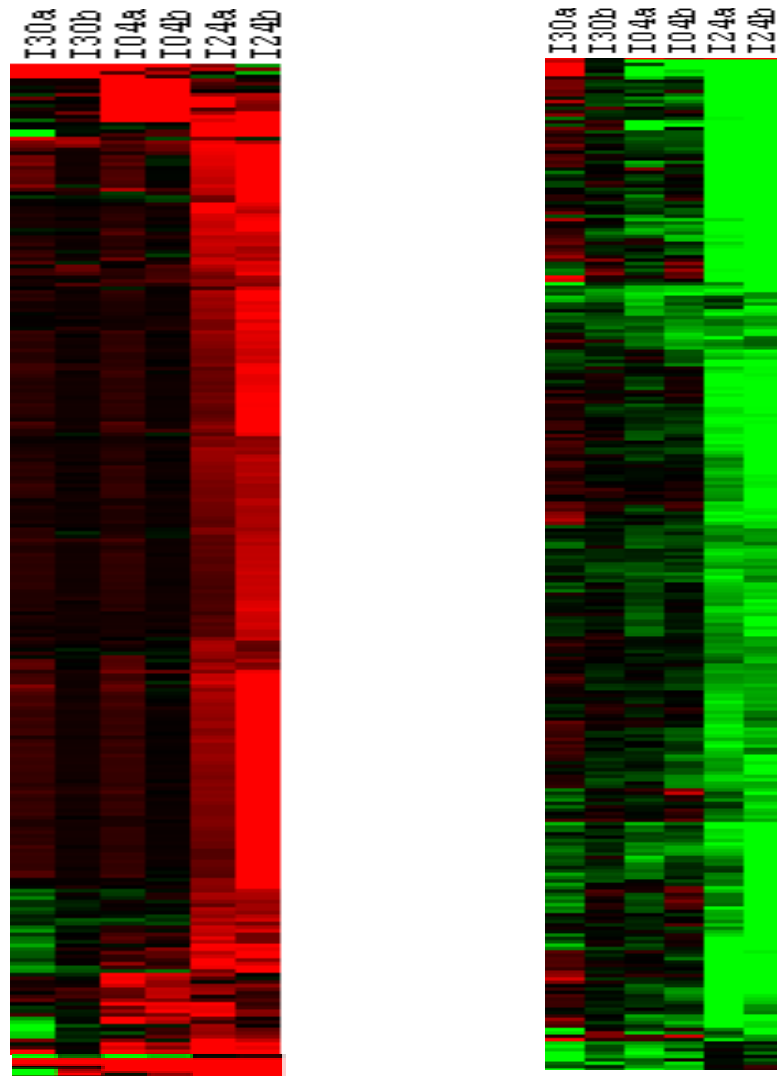


Gráfico 4.23. Clusterização hierárquica dos DEG.

Cada linha representa um dos 678 DEG selecionados.

As colunas representam os diferentes pontos avaliados do processo infeccioso, sendo que a cor vermelha e verde representam aumento e diminuição, respectivamente, dos níveis de mRNA durante o processo de infecção.

As diferentes graduações representam níveis distintos de modulação.

A cor preta representa a ausência de modulação.

#### 4.4 Resultado da análise por GO

Através da utilização do programa GO Browser, disponível no site da Affymetrix (<https://www.affymetrix.com/analysis>), foi possível analisar quantitativamente os 678 DEG em relação à classificação por GO, após o agrupamento descrito no item 4.3.

#### 4.4.1 *Contagens dos principais GOs*

Os termos gênicos mais comuns, dentro dos três grupos principais de ontologia gênica do GO (função molecular, processo biológico e componente celular), foram identificados. O propósito dessa análise é caracterizar o processo de infecção de acordo com os termos gênicos mais presentes nos genes modulados, sem significar necessariamente que o termo está sobre-representando nos DEG. Portanto, essa análise tem uma função mais descritiva do que analítica. Esse último tipo de análise será feita mais adiante.

Na tabela 4.1 estão descritos os termos GO mais encontrados nos 678 DEG, de acordo com a classificação de função molecular. Esse tipo de nomenclatura reflete uma classificação mais generalizada e, portanto, possui uma utilidade mais limitada, pois genes com função biológica distinta podem ter a mesma classificação molecular. No entanto, é possível verificar que existem diversas funções moleculares relacionados à ligação, como elementos sinalizadores (cálcio, n=28), metabólicos (ATP, n=55; GTP, n=16; carboidratos, n=12), reguladores (ligação a DNA, n=78, transcrição, n=87, RNA, n=12). Outra função de ligação interessante é com relação a proteínas do citoesqueleto (n=14).

Na tabela 4.2 estão descritos os termos GO mais encontrados nos 678 DEG, de acordo com a classificação de processo biológico. Esse tipo de nomenclatura possui o maior potencial analítico de descrição do fenômeno biológico abordado nesse trabalho, pois insere os genes dentro de um contexto funcional biológico e não molecular, conforme o descrito no parágrafo acima.

A análise dos processos biológicos mais comuns ressalta a importância dos fatores transcricionais como sendo modulados em grande quantidade pelo processo de infecção por *T. gondii* (n=85). Outros termos muito importantes são os relacionados a modificações protéicas (modificação protéica, n=72; proteólise, n=34, ciclo de ubiquitina, n=26; fosforilação, n=26; transporte intracelular de proteínas, n=26; biossíntese de proteínas, n=13; desfosforilação, n=13), evidenciando as diversas alterações traducionais e pós-traducionais presentes no processo infeccioso.

Conforme esperado, diversos genes relacionados à resposta imunológica foram identificados (resposta imune, n=30; apoptose, n=24; resposta a patógenos, n=17; regulação da apoptose, n=14; resposta inflamatória, n=10). Além disso, alterações na morfologia e estrutura interna da célula foram evidenciados (morfogênese celular, n=26; organização do citoesqueleto, n=24; migração celular, n=12; biogênese e manutenção do citoesqueleto de actina, n=10).

Tabela 4.1. Termos GO mais comuns de função molecular dentre os 678 DEG

<b>GOs</b>	<b>nº de genes</b>
Ligação a DNA	78
Ligação a ATP	55
Atividade de regulação da transcrição	48
Atividade de fator de transcrição	39
Atividade quinase	33
Ligação a cálcio	28
Ligação a GTP	16
Ligação a proteínas do citoesqueleto	14
Atividade de transporte de proteínas	14
Atividade ATPase	13
Ligação a RNA	12
Ligação a carboidrato	12
Ligação a magnésio	11
Atividade de fator de crescimento	11
Atividade de transporte de elétrons	10
Atividade de repressor transcricional	8
Atividade regulatória de pequenas GTPases	7
Atividade motora	6
Atividade de citocina	6
Atividade ativadora de GTPases	6
Atividade de endonucleases	5

Todos esses termos demonstram as alterações profundas que o *Toxoplasma gondii* induz na célula hospedeira, modificando de forma muito importante o seu transcriptoma, seu proteoma, seu perfil de mediadores imunes e a sua estrutura celular.

Na tabela 4.3 estão descritos os termos GO mais encontrados nos 678 DEG, de acordo com a classificação de componente celular. Esse tipo de nomenclatura é o que apresenta o menor número de termos e, portanto, muitas vezes é muito genérico. De qualquer forma, é possível evidenciar componentes celulares importantes, principalmente naqueles cuja classificação é menos genérica.



Tabela 4.2. Termos GO mais comuns de processo biológico dentre os 678 DEG

GOs	nº de genes
Regulação da transcrição	85
Modificação protéica	72
Proteólise	34
Resposta imune	30
Ciclo de ubiquitina	26
Fosforilação	26
Morfogênese celular	26
Transporte intracelular de proteínas	26
Apoptose	24
Organização do citoesqueleto	24
Regulação do ciclo celular	24
Desenvolvimento do sistema nervoso	23
Metabolismo de lipídeos	22
Metabolismo de ácido Carboxílico	20
Transporte de cátions	20
Resposta a patógenos	17
Transporte de elétrons	17
Transdução de sinal mediada por pequenas GTPases	16
Regulação da apoptose	14
Replicação do DNA	14
Biosíntese de proteína	13
Desfosforilação	13
Endocitose	13
Proteína ( <i>fold</i> ing)	13
Gametogênese	13
Migração celular	12
Regulação da proliferação celular	12
Resposta a estímulo químico	12
Ciclo celular (mitose)	11
Estabelecimento e manutenção da arquitetura da cromatina	11
Regulação da transcrição por promotores RNA Pol. II	11
Reparo do DNA	11
Biogênese e organização do citoesqueleto de actina	10
Metabolismo de ácidos Gráxos	10
Processamento de RNA	10
Resposta inflamatória	10
Secreção	10

Esses termos são citoesqueleto (n=39), mitocôndria (n=37), retículo endoplasmático (n=33), Complexo de Golgi (n=12), matriz extracelular (n=11) e sistema endossomo-lisossomo (n=14).

Tabela 4.3. Termos GO mais comuns de componente celular dentre os 678 DEG

GOs	nº de genes
Espaço extracelular	83
Membrana plasmática	59
Citoesqueleto	39
Mitocôndria	37
Retículo endoplasmático	33
Lúmen nuclear	28
Vesícula citoplasmática	15
Aparato do Golgi	12
Citosol	12
Cromossomo	12
Matriz extracelular	11
Vacúolo	9
Lisossomo	8
Cromatina	6
Endossomo	6

#### 4.4.2 Análise de termos GO enriquecidos considerando todos DEG

A análise realizada com termos GO evidenciou até o momento aqueles termos mais frequentes, independente de sua proporção relativa estar ou não aumentadas ou diminuídas na infecção. Com o intuito de evidenciar os termos mais enriquecidos no processo infeccioso, realizamos uma análise estatística, através do teste de qui-quadrado, pelo programa GO Browser.

Na figura 4.1, está representada a forma como um nó dos gráficos de GO será representado. Dentro de cada nó (caixa) há a identificação do termo GO (ID e descrição), o número de genes identificados, a proporção dentre todos os genes presentes no microarranjo classificado com esse GO (% de genes deste GO), o valor de qui-quadrado e o valor de probabilidade associado. A coloração da caixa representa também o grau de enriquecimento do termo GO, sendo que a escala varia do azul até o vermelho, do menos enriquecido até o mais enriquecido.

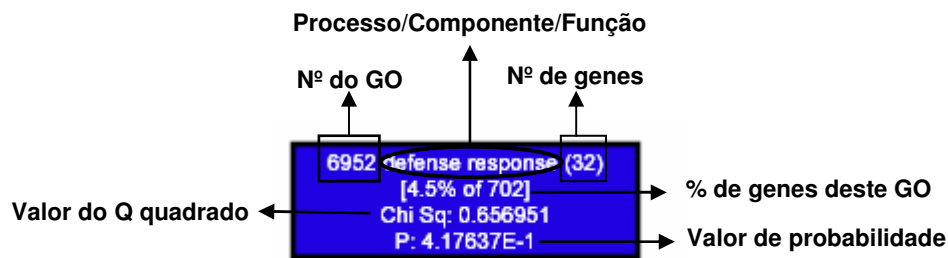


Figura 4.1. Descrição dos elementos caracterizando os termos GO.

#### 4.4.2.1 Termos GO de processo biológico enriquecidos no conjunto total de DEG

Os termos GO de processo biológico mais enriquecidos, dentre todos os 678 DEG, estão representados nas figuras 4.2 e 4.3.

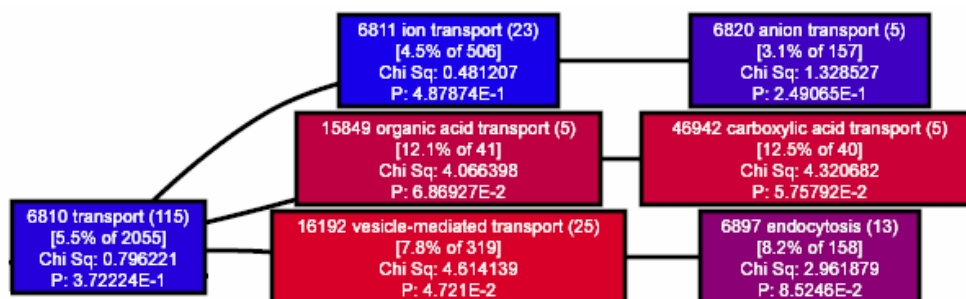


Figura 4.2. Termos GO sobre-representados relativos a transporte

Na figura 4.2 estão representados os grupos enriquecidos relativos a transporte. Foram selecionados cinco genes envolvidos no transporte de ácido carboxilílico ( $p=5,8 \times 10^{-2}$ ). Também foram identificados vinte cinco genes de transporte mediado por vesículas ( $p=4,7 \times 10^{-2}$ ).

Na figura 4.3 estão representados os grupos enriquecidos relativo a sinalização, no qual se evidencia o enriquecimento da via de sinalização por TGF- $\beta$ , no qual foram identificados 6 genes, de um total de 47 genes anotados com esse termo presente no microarranjo (12,7%), com um valor de probabilidade de 2,7%.

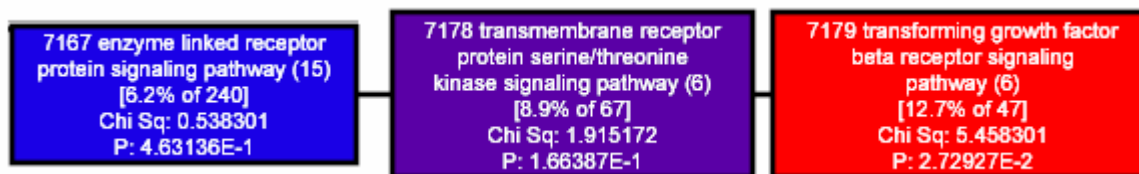


Figura 4.3. Termos GO sobre-representados relativos a sinalização.

#### 4.4.2.2 Termos GO de componente celular enriquecidos no conjunto total de DEG

O termo GO de componente celular mais enriquecido, dentre todos os 678 DEG, está representado nas figuras 4.4. Esse termo, complexo protéico, representa uma classificação muito genérica.

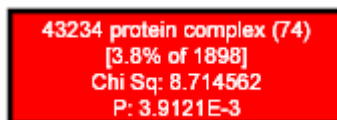


Figura 4.4. Termo GO sobre-representados relativos a complexo protéico

#### 4.4.2.3 Termos GO de função molecular enriquecidos no conjunto total de DEG

O termo GO de processo biológico mais enriquecido, dentre todos os 678 DEG, está representado na figura 4.5. A atividade de transporte de proteína está aumentada, tendo-se identificado 14 genes (10,5% do total presente no microarranjo), com um valor de p igual a 0,7%.

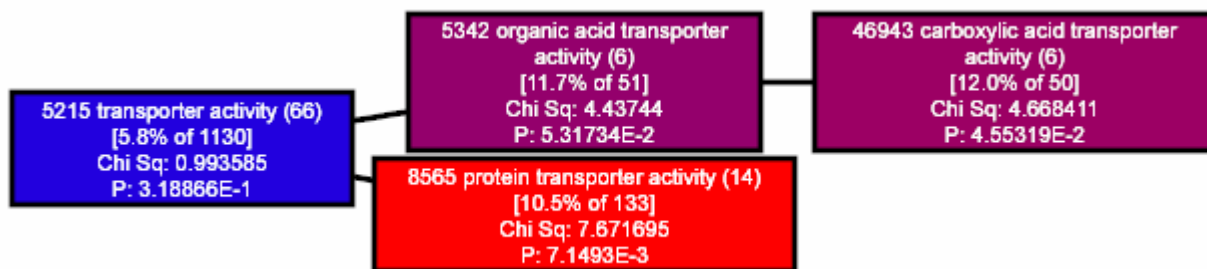


Figura 4.5. Termo GO sobre-representados relativos a atividade de transporte

#### 4.4.3 Comparação dos genes aumentados e diminuídos em 24 horas de infecção

A fim de identificar termos GO que estariam sendo modulados de forma diferencial durante o processo de infecção por *Toxoplasma gondii*, com relação ao aumento e diminuição em uma mesma fração temporal, usamos o programa eGOn, o qual compara a distribuição de termos GO dentre os dois grupos, visando identificar termos sub ou sobre representados. A partir dos resultados do agrupamento hierárquico descrito acima, fizemos as comparações entre os grupos. Somente a comparação entre 24 horas aumentado e 24 horas diminuído forneceu termos

GO que estão diferencialmente representados, sendo que os demais grupos não apresentaram diferenças, em geral por conterem pouco genes.

Na tabela 4.4 estão representados os termos GO de processo biológico mais diferencialmente representados entre os genes aumentados e diminuídos em 24 horas, com um valor de p limite de 5%.

Tabela 4.4. Termos GO de processo biológico diferencialmente representados entre 24 horas aumentado e diminuído

NAME	GC_UP_24HS	GC_DOWN_24HS	TWOTAIL
biological_process	153	185	
cell death	1	8	0.044
cell organization and biogenesis	17	37	0.036
aromatic compound metabolism	4	0	0.041
cellular biosynthesis	16	7	0.017
cellular lipid metabolism	2	12	0.025
death	1	9	0.025
cellular localization	6	20	0.023
establishment of cellular localization	6	20	0.023
establishment of protein localization	2	25	0.000
protein localization	2	25	0.000
catabolism	3	14	0.023
macromolecule biosynthesis	8	2	0.048
macromolecule catabolism	1	11	0.014
protein catabolism	1	8	0.044
lipid metabolism	3	15	0.014
organismal physiological process	27	12	0.002
response to stimulus	26	17	0.034

Os termos contendo uma sobre-representação de genes com expressão diminuída em 24 horas foram: estabelecimento da localização celular ( $p \leq 0,001$ ), localização de proteínas ( $p \leq 0,001$ ), catabolismo macromolecular ( $p = 0,014$ ), metabolismo de lipídios ( $p = 0,014$ ), estabelecimento de localização celular ( $p = 0,023$ ), organização celular e biogênese ( $p = 0,036$ ) e morte celular ( $p = 0,044$ ).

Os termos contendo uma sobre-representação de genes com expressão aumentada em 24 horas foram: processos fisiológicos ( $p = 0,002$ ), biossíntese celular ( $p = 0,017$ ), resposta a estímulo ( $p = 0,034$ ), metabolismo de compostos aromáticos ( $p = 0,041$ ) e biossíntese de macromoléculas ( $p = 0,048$ ).

Na tabela 4.5 estão representados os termos GO de componente celular mais diferencialmente representados entre os genes aumentados e diminuídos em 24 horas, com um valor de p limite de 5%.

Tabela 4.5. Termos GO de componente celular diferencialmente representados entre 24 horas aumentado e diminuído

NAME	GC_UP_24HS	GC_DOWN_24HS	TWOTAIL
cellular_component	154	191	
cell fraction	2	14	0.009
intracellular	85	131	0.014
cytoplasm	35	72	0.003
Golgi apparatus	2	15	0.005
endoplasmic reticulum	4	20	0.005
vacuole	0	6	0.035
endomembrane system	1	8	0.046
intrinsic to plasma membrane	11	4	0.032
plasma membrane	31	14	0.001
cellular component unknown	3	19	0.003
extracellular region	42	31	0.017
extracellular space	40	29	0.015

Os termos contendo uma sobre-representação de genes com expressão diminuída em 24 horas foram: componente celular desconhecido (p=0,003), Complexo de Golgi (p=0,005), retículo endoplasmático (p=0,005) e vacúolo (p=0,035)

Os termos contendo uma sobre-representação de genes com expressão aumentada em 24 horas foram: membrana plasmática (p=0,001) e espaço extra-celular (p=0,015).

Na tabela 4.6 estão representados os termos GO de função molecular mais diferencialmente representados entre os genes aumentados e diminuídos em 24 horas, com um valor de p limite de 5%.

Só foram encontrados termos contendo uma sobre-representação de genes com expressão aumentada em 24 horas, os quais foram: atividade de transdução de sinal (p=0,002), ligação a carboidrato (p=0,027) e ligação a íons metálicos (p=0,045).

Tabela 4.6. Termos GO de componente celular diferencialmente representados entre 24 horas aumentado e diminuído

NAME	GC_UP_24HS	GC_DOWN_24HS	TWOTAIL
molecular_function	168	195	
carbohydrate binding	9	2	0.027
alkali metal ion binding	4	0	0.045
signal transducer activity	40	22	0.002

## 4.5 Análise por redes gênicas

A análise por redes gênicas será feita selecionando-se os genes diferencialmente expressos através do uso de um filtro baseado somente na razão de mudança (FC), diferentemente do que foi feito até o momento, onde foi utilizado um critério de filtro estatístico e de razão de mudança.

Essa alteração de critérios se justifica pelo fato de que enquanto nas análises anteriores estávamos interessados em trabalhar com genes individuais e, portanto, necessitávamos de uma medida de confiabilidade da expressão diferencial do gene, na análise por redes gênicas, o elemento que deve ser avaliado é a própria rede e não os genes individuais. A filtragem prévia dos genes é importante para salientarmos as características inerentes do processo estudado (sem filtro estaríamos avaliando as redes presentes no microarranjo e não as redes moduladas durante o processo de infecção), mas o uso de confiabilidade estatística nos genes e não nas próprias redes representa uma perda de informação.

Por essas razões foram utilizados para a análise de redes gênicas a seleção de genes que passaram pelo critério de FC igual a 2 vezes, em cada uma das condições experimentais. Foi gerada três listagem pelo programa, sendo selecionado os genes modulados 2 vezes ou mais em relação ao controle em 30 minutos de infecção (n=112 genes), 4 horas de infecção (n=419 genes) e 24 horas de infecção (n=1483 genes).

Para uma análise mais descritiva da rede, foi definido que seria selecionados os genes mais centrais e que apresentavam as mudanças mais fortes. Como a descrição simples das redes gênicas ficaria muito árida, foi incluído uma discussão preliminar referentes aos genes contidos dentro das mesmas.

#### 4.5.1 Resultados dos genes selecionados em 30 minutos de infecção

Analisando somente os dados de 30 minutos de infecção, foram selecionadas 3 redes gênicas que se encontravam sobre-representadas, com confiabilidade estatística, cujos genes constituintes e as funções mais comuns estão representadas na tabela 4.7.

Tabela 4.7. Redes gênicas mais afetadas no tempo de 30 minutos de infecção

<input type="checkbox"/>	▲ ID	Genes	Score	Focus Genes	Top Functions
<input checked="" type="checkbox"/>	1	↑ATF3*, ↑BTG2, ↓CCND1*, ↑CREM*, ↑CSF2, ↑CXCL1, ↑CYR61, ↑DUSP1, ↑DUSP6*, ↑EGR1*, ↑EGR2*, ↑FOS*, ↑FOSB, ↓GADD45G, ↑GDF15, ↑HAS1, ↓HAS2, ↑IER3, ↓IFI202B*, ↓IGFBP3*, ↑IL6, ↓IL1RL1*, ↑IRF1, ↑IRS2, ↑JUN, ↑JUNB*, ↑NFKBIA, ↑NFKBIZ*, ↑NR4A1, ↑PER1, ↑PIM1*, ↑RHOB, ↑SGK, ↓SPP1, ↑TNFAIP3	79	35	Cell Death, Cellular Growth and Proliferation, Cancer
<input checked="" type="checkbox"/>	2	↑CCRN4L*, CD1B, CD1C, ↑CDKN1A*, ↓CMKOR1, ↓COL6A3, ↑CREBBP, ↓DHODH*, ↓DHX9, ↑DLG7, ↑DNCL1, ↓DUSP9*, ↑EREG*, ↑FOSB, ↓GBP2, ↑GDF15, ↓HRSP12*, ↑IER2, ↑IER3, ↑IFI203*, ↑IFIT3, ↑IL4*, ↓IL1RL1*, ↑KIF20A*, ↓KLF10*, ↓LGALS3BP, ↓LUM, ↓MEOX1, ↑NAB2, ↑S100A8, ↓TCTE3, ↓TFPI2, ↑TNF, ↓TNFSF9, ↑ZFP36	32	19	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Immune Response
<input checked="" type="checkbox"/>	3	↓AGTR2*, ANKS1, ↑ANLN, ↑BAG3*, ↓BCL2*, ↓BNIP3, ↓CAPZB*, ↑CKAP2, ↓CLCN3*, ↓CTSH, ↑DKFZP762E1312, ↑DNAJB1, E2F4, ↑EGF*, ↑FN1, ↑FOSB, ↓GART, ↓GREM2, ↓HAS2, HMMR, ↑IFNG, ↓IGF1*, ↑MIG-6*, ↑MI167, ↑MYC, ↓MYOD1, ↑NEK2, ↑NR4A2*, ↓PDK1, ↑PHLDA1, ↑SNAI1, ↓TP53*, ↑TTK, ↑UBE2T, ↑ZBTB16*	25	16	Cell Cycle, Cellular Growth and Proliferation, Connective Tissue Development and Function

Essas três redes apresentam pontos de conexão, os quais são os genes *fosb*, *gdf15*, *ier3* e *il1rl1* entre as redes 1 e 2; *fosb* e *has2* entre as redes 1 e 3. O gene *fosb* conecta as redes 2 e 3 e, portanto, é um elemento comum às três redes. Este gene apresentou um aumento de sua expressão nos dados de trinta minutos de interação de aproximadamente trinta vezes em relação ao controle (não infectado).

A primeira rede selecionada em trinta minutos de infecção está representada na figura 4.6. Essa rede apresenta a grande maioria de seus genes moduladas, com um padrão geral de aumento, tendo alguns poucos genes diminuídos. De maneira geral, os genes que estão estimulados (*nfkbia*, *nfkbiz*, *jun*, *junb*, *fos*, *fosb*, *egr1*, *egr2*, *btg2*, *crem*, *tnfaip3* e *atf3*) possuem uma função anti-apoptótica (WAN & DE GREGORI, 2003; VIROLLE *et al.*, 2003; SERVILLO *et. al.*, 1998; MANTAMADIOTIS *et. al.*, 2002; KAWAUCHI *et. al.*, 2002).

O aumento da proteína Fos reduz a expressão de Il1r1 (KESSLER *et. al.*, 1994), o que pode ser verificado na representação dessa rede (figura 4.6). Essa proteína, juntamente com FOSB, JUN e JUNB, forma o complexo transcricional AP-1, que está presente em tecido muscular participando do processo de miogênese (ANDREUCCI *et. al.*, 2002).



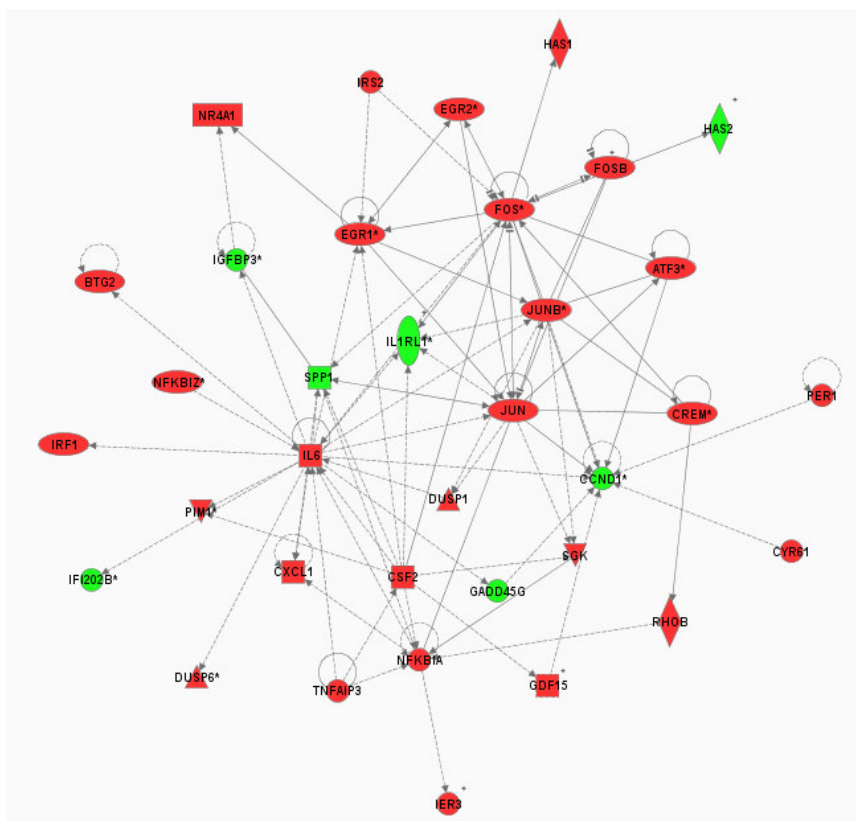


Figura 4.6. Rede gênica 1, modulada em 30 minutos (crescimento e morte celular)

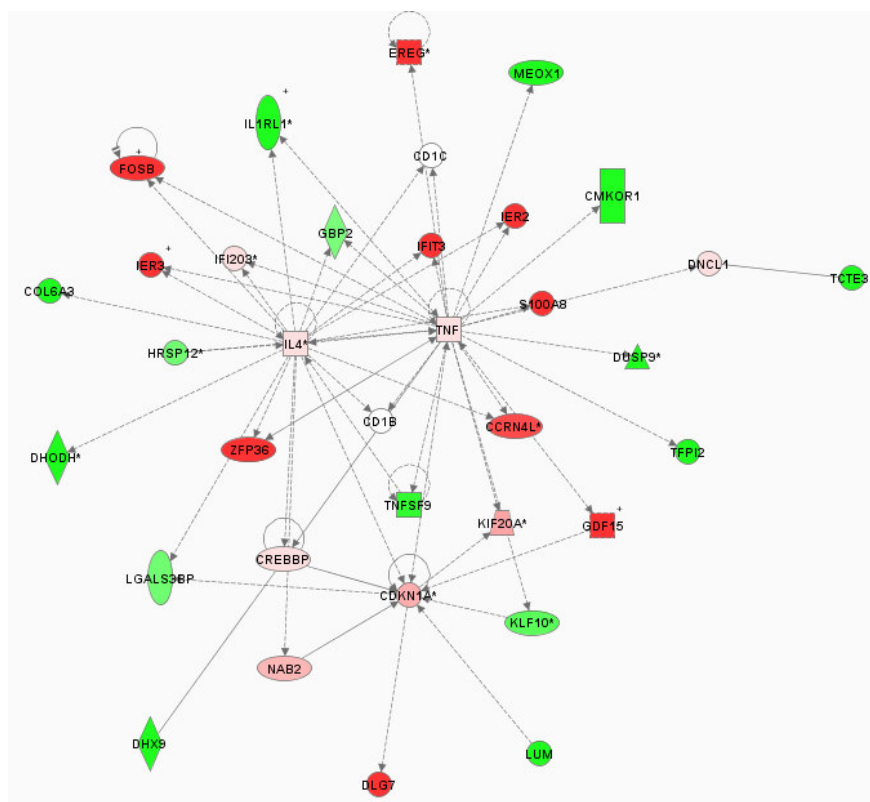


Figura 4.7. Rede gênica 2, modulada em 30 minutos (crescimento e morte celular)

A segunda rede selecionada em trinta minutos de infecção está representada na figura 4.7. Conforme mencionado acima, essa rede está conectada à primeira rede pelo gene *fosb*. Como padrão geral dessa rede, ela apresenta seus elementos centrais praticamente não modulados (*il4*, *tnf* e *cdkn1a*) ou aumentados (*zfp36*, *ccrn4l*, *ifit3*), enquanto que os genes mais periféricos estão em geral diminuídos. Essa rede está envolvida principalmente em sinalização celular, a qual está portanto, em geral, diminuída.

A terceira rede selecionada em trinta minutos de infecção está representada na figura 4.8. Está rede está envolvida principalmente em ciclo celular e proliferação, incluindo alguns genes (*zbtb16*, *phld1* e *nr4a2*) anti-apoptóticos (NEEF *et. al.*, 2002; SAUCEDO-CARDENAS *et. al.*, 1998) que da mesma forma que na primeira rede de trinta minutos, estão aumentados.

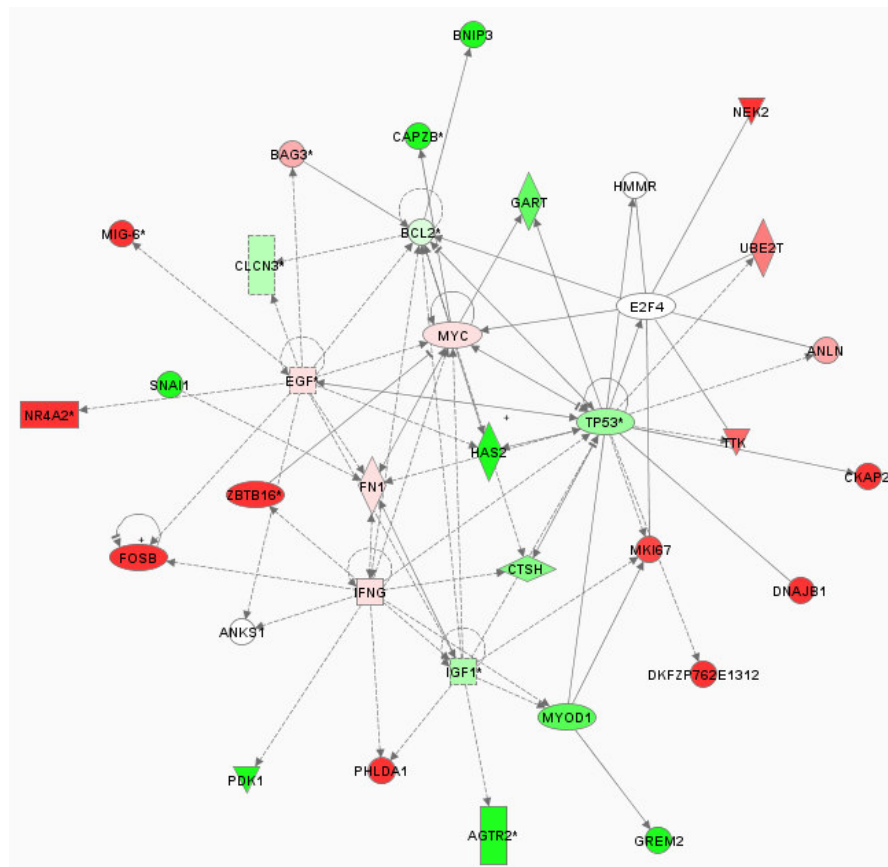


Figura 4.8. Rede gênica 3, modulada em 30 minutos (ciclo celular e crescimento)

De maneira geral, as redes moduladas em 30 minutos são relacionadas à proliferação celular. O fato de que é possível identificar nessas redes as mudanças mais iniciais do processo de infecção reforça a importância desses eventos na evolução desse fenômeno biológico.

#### 4.5.2 Resultados dos genes selecionados em 4 horas de infecção

Analisando somente os dados de 4 horas de infecção, foram selecionadas 11 redes gênicas que se encontravam sobre-representadas, com confiabilidade estatística, cujos genes constituintes e as funções mais comuns estão representadas na tabela 4.8.

Tabela 4.8. Redes gênicas mais afetadas no tempo de 4 horas de infecção

ID	Genes	Score	Focus Genes	Top Functions
1	↑ADORA2B*, ↑BTRC*, ↑CD83*, ↑CDC7, ↑CDKN2B, ↑CDKN2D, ↑CXCL1, ↑CXCL2*, ↑CXCL6, ↑DUSP6*, ↓ENO2, ↑GADD45B*, ↑IFIT2, ↑IL6, ↑IL1R1, ↑IL1RL1*, ↑IL1RN, ↑IRAS, ↑MAP3K8*, ↑MCM2*, ↑MCM4, ↑MYB*, ↑NFKB1, ↑NFKBIA, ↑NFKBIZ*, ↑PLK1*, ↑PTGS2, ↓RASSF5, ↑RELB*, ↑RIN2, ↑SNAI1, ↑TNFAIP3, ↑TNFRSF11B, ↑TXNIP*, ↑WEE1	57	35	Inflammatory Disease, Cancer, Cellular Growth and Proliferation
2	↑ACSL4*, ↑ADM, ↑AMD1*, ↑ATE3*, ↑CAST (CALPASTATIN), ↑CCND1*, ↑CDC25A*, ↑CDCA7, ↑CPT2*, ↑DNMT1*, ↑EGR2*, ↑FOS*, ↑FOSB, ↑FOSL1, ↑GDF15, ↑HAS2, ↑ID2, ↑IMP-1, ↑JUNB*, ↑LMMNB1, ↑MYC, ↑NOL5A*, ↑ORC1L, ↑PDGFRB, ↑PTPN2, ↑RBL1, ↑S100A1*, ↑S100A4, ↑SDC1*, ↑SFRS5*, ↑SHMT1*, ↑SLC16A1, ↑TFRCC*, ↑TYMS, ↑UBTF*	57	35	Cancer, Cell Morphology, Cellular Growth and Proliferation
3	↑ABCB1, ↑AGTR2*, ↑AHR, ↑AREG, ↑ARNTL, ↓BCL6, ↑CCL13, ↑CISH*, ↑CSF2, ↑CSF3, ↑CXCL12*, ↓DBP, ↓DMPK, ↓DNM1*, ↓EGR1*, ↑EREG*, ↑FGF2, ↑FLT1*, ↑HBEGF, ↑HK2*, ↑IGFBP3*, ↑IL11, ↓LDLR, ↓MMP11, ↑NR2F1, ↑NR4A1, ↑PTGER2, ↑RARG, ↓SHC1*, ↓SMAD6, ↑SOC1*, ↓SOC3*, ↑TGFBRI1, ↑TIMP3, ↓VCAM1*	57	35	Cell Death, Cellular Growth and Proliferation, Tissue Morphology
4	↑2900074L1ORIK*, ↑ALCAM, ↑ATE3*, ↑CCL5, ↑CCL7, ↑CCNG2, ↑CD24, ↑CD83*, CD163, ↑CD40LG, ↑CXCL1, ↑CXCL2*, ↑DUSP2, ↓ECGF1, ↑FGL2*, ↑FOSB, ↑IER2, ↓IFIT2, ↑IFNG, ↑IL13RA1, ↑INDO*, ↑MARC15L1, ↑NFATC1, ↓NR1D1, ↑PBEF1, ↓PFTK1*, ↑PHLDA1, ↑PPIF, ↓PSME1*, ↓PSME2*, ↑SERPINA3G, ↑SOC2, ↑TNFSF9, ↑TNFSF11, ↓ZFP260*	26	22	Cell Death, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation
5	↑ADAM17, ↑ALDH1A3, ↓BCL6, ↑BHLHB2, ↑CCL7, ↑CCR3, ↑CCRN4*, ↓CDC37, ↑CH25H, ↓CLOCK, ↑CXCL1*, ↑CXCL1, ↓DDIT3, ↓DSRC1, ↑DUSP1, ↑F11R, ↑GPT2, ↑GJA1*, ↓HSPB2*, ↓IL18LG, ↑MAP3K1*, ↑MAP3K3*, ↑MAP4L2, ↓MAP4L3*, MAP4L5, ↑MAT2A, ↓MEDX1, ↑NFATC1, ↑PDRG1, ↑RPS13, ↑TIMP2*, ↑TDP1*, ↑TNF, ↑TNFSF9, ↑TWIST2	21	19	Cell Death, Cellular Movement, Hematological System Development and Function
6	↓APCDD1, ↓AP5, ↑AREG, ↑ASB6*, ↓CDKN2B, ↑CTBP2*, ↓DNMT1*, ↓DUSP1, ↓FDF11, ↓FZD2, ↑GJB2, ↑HELIS, ↑HRAS, ↑IBRD3, ↓IGF2*, ↓IGFBP6, ↓ILF3*, ↑IL15, ↓IRT19*, ↓MCRS1, ↓MXD4, ↓NOL1, ↓PAFAH1B3*, ↓PDCD4, ↓PDE6D, ↑PSPC1, ↑PTEN*, ↓RAS44, ↑SLC20A1, ↓SOX4*, ↑TOM1, ↑ULU2, ↓URB, ↓WISP2, ↑WNT1	21	19	Cancer, Reproductive System Disease, Tumor Morphology
7	↓ALDH1A1*, ↓AMOTL2, ↑ANGPTL4*, ↑AREG, ↓CRAT*, ↑CREM*, ↑CRSP2, ↑CTNNB1, ↓DN13, ↑EEA1, ↑EGF*, ↑FNI, ↑FOSB, ↑FST, ↓GGPOT*, ↓GJB3, ↑IL1R1, ↑IRX2D, ↑IRXBC, ↑MIM1*, ↑MYC*, PDE3A, ↓PEA15, ↑PHLDA2, ↑PPARG, ↓RPSA, ↓SDC1*, ↓SDPR, ↑SFRS1*, ↓SIM1, ↑SLC38A2*, ↓SOX4*, ↓SOX11*, ↓TAX1BP3*, ↑TCF4	21	19	DNA Replication, Recombination, and Repair, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry
8	↓BCL2L1*, ↓BNIP3L, ↓BPGM, ↓C3ORF10, ↑CASP8AP2*, ↑CD83*, ↓CDH1, ↑CLDN4, ↓COL6A3, ↓DUSP11, ↓ELK3, ↓ENO1, ↑G3BP1, ↑GABPB2*, ↑GDI2*, ↑HAS1, ↑IER2, ↑IFIT2, ↑IL4*, ↑IL11, ↑IL15, ↑IL13RA2, ↓ITPR2*, ↓LSP1*, ↓LTC4S*, ↓MVK*, ↓NET1, ↓NF, ↑NUMB*, ↓PVRL2*, ↑SFRS7*, ↑TGFB1, ↑USP10*, ↓VDAC3, ↑VIL2	19	18	Cell Morphology, Hematological System Development and Function, Immune and Lymphatic System Development and Function
9	↓ADCY7, ↓ATF1, ↑BAZ1B*, ↑CEBPA, ↑CHRN3*, CB2, ↓CREG1, ↓DTX2, E2F4, ↑ENPP2*, ↑FAM160A, ↑GCH1, ↑GUCA2A, HBP1, ↑HMGB3, ↑IL1B, ↓H167, ↓MYBP1, ↓MYO1, ↓MYO6, ↓ORC1L, ↑PABRN1, ↑PCDH7*, ↑PROCR, ↑PTG3, ↓RBI1*, ↑RGS2, ↑RRS1, ↑S100A8, ↑SERPINB2, ↑SFPQ*, ↑SMARCSA*, ↑THBD*, ↑TNFAIP6, ↑TUNG*	19	18	Cellular Development, Skeletal and Muscular System Development and Function, Connective Tissue Development and Function
10	↑ADCYAP1, ↑ADM, ↑AK3*, ↑ASK1*, ↑BAG2*, ↓BHLH, ↑BTG2, ↑C9ORF76, ↓COL, ↓CDINDA, ↑CREB1*, ↓DKK2, ↓DUSP1, ↑EZH2, ↑FST, HIST3, ↑HMGB2, ↓KCNNA, ↑MAPK14, ↓NSDHL*, ↑OAZIN, ↑PENK*, ↑FLAG1*, ↑RGC32, ↓RNF2*, ↓RPS6LA4, ↓SLBP, ↑SLU12*, ↑TCOF1, ↑TK1*, ↓TMPO*, ↑TULP4, ↑TDRD1, ↑UBP1, ↑UPP1*	16	16	Cancer, Cell Morphology, Neurological Disease
11	↓ANLN, ↓ASPM, C10ORF3, ↑C14ORF106, ↑CCNE2, ↓CDKN1A*, ↑CHAF1B, ↑CROP, ↓DIEP2762E1312, ↑EDG3, FAT2, ↑FGF1, ↑FLJ20364, ↑GEM, ↑H2AFZ, IBDCC2, IIAA1794, ↓LATS2, ↑MAP11*, ↓MARCKS, ↑NUSAP1*, ↓PLU2, ↑RGS16*, ↑ROCK2, ↑S100A13*, SERPINI2, ↓TCN2, ↓TP53*, TRIM44, ↑UBE2T, ↑UHRF1, ↑WDHD1, ↓WISP2, ZBTB5, ZNF84	10	12	Cell Cycle, Cellular Movement, Cancer

Estas redes apresentam diversos genes que as conectam conforme pode ser visto esquematicamente na figura 4.9.

Verificamos que as redes que contém um número maior de genes relacionados são as redes cinco e quatro, contendo os genes *ccl7*, *cxcl1*, *nfatc1* e *tnfsf9* e as redes um e quatro contendo os genes *cxcl2*, *cxcl1*, *cd83* e *ifit2*. Assim, o gene *cxcl1* se apresentou conectado a três redes.

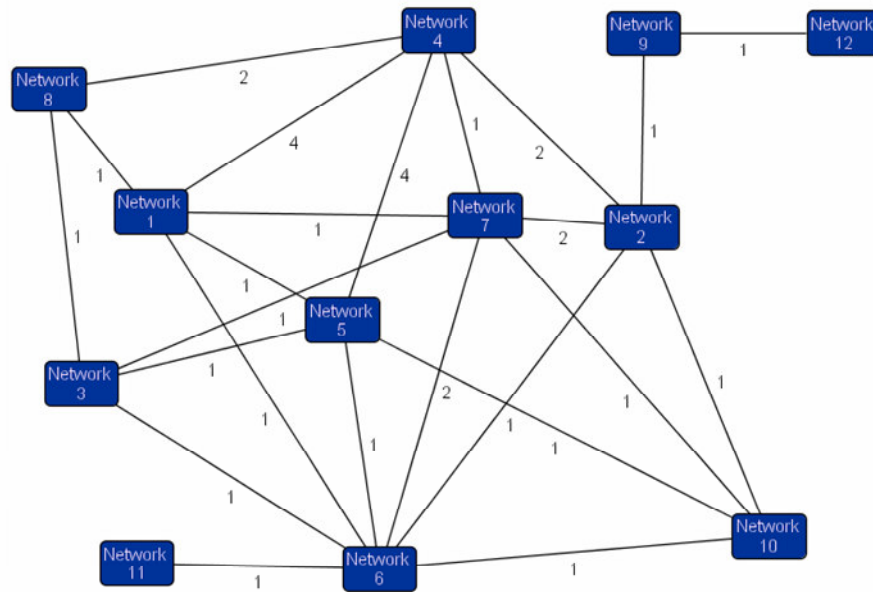


Figura 4.9. Representação esquemática dos genes conectando as redes de 4 horas.

A primeira rede de 4 horas (figura 4.10) apresenta diversos elementos em comum com a primeira rede de 30 minutos. Uma das principais diferenças é que os genes componentes do fator transcricional AP-1 (*fos*, *fosb*, *jun* e *junb*) não estão presentes na rede de 4 horas. Eles agora estão representados em uma rede a parte (segunda rede de 4 horas). Um dos principais motivos da separação dessa rede é que em 4 horas, diversos genes relacionados ao processo inflamatório foram incluídos, aumentando a representatividade desses elementos (*cxcl1*, *cxcl2*, *cxcl6*, *il6* e *il1r1*), fazendo com que a representação da primeira rede de 30 minutos fosse quebrada nas redes 1, 2 e 7 (a qual conecta as redes 1 e 2 em 4 horas).

Alguns genes que se apresentam diminuídos nessa rede estão envolvidos com o controle do ciclo celular, como *cdkn2b* e *cdkn2d*.

Na figura 4.11, está representada a segunda rede de 4 horas. Nessa rede é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *egr2*, *has2*, *fos*, *fosb*, *junb* e *atf3*, os quais estavam presentes na primeira rede de 30 minutos. Todos esses genes estavam aumentados, com exceção de *has2*, que inicialmente estava diminuída (~2 vezes) e agora está aumentada (~3 vezes).

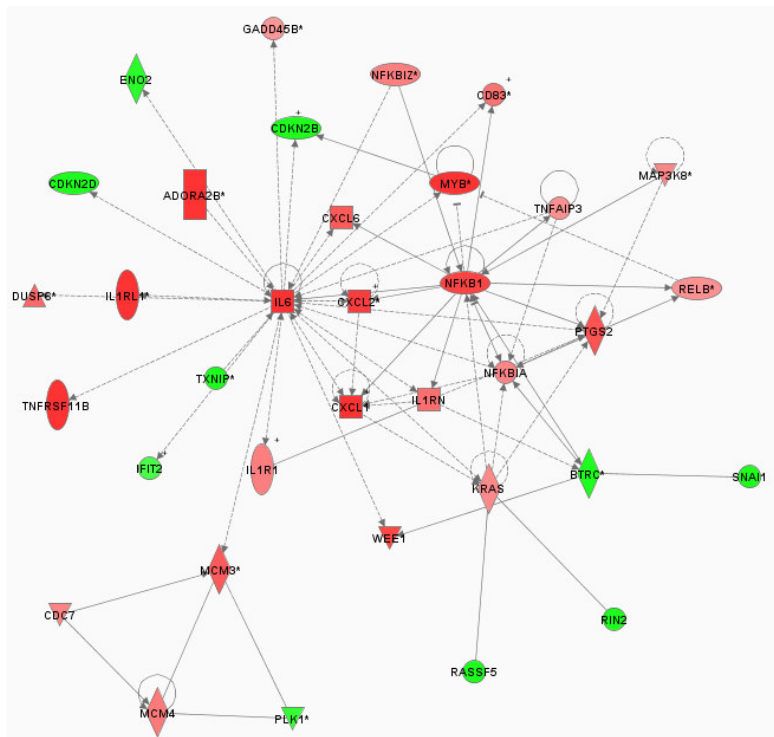


Figura 4.10. Rede gênica 1, modulada em 4 horas (inflamação, crescimento)

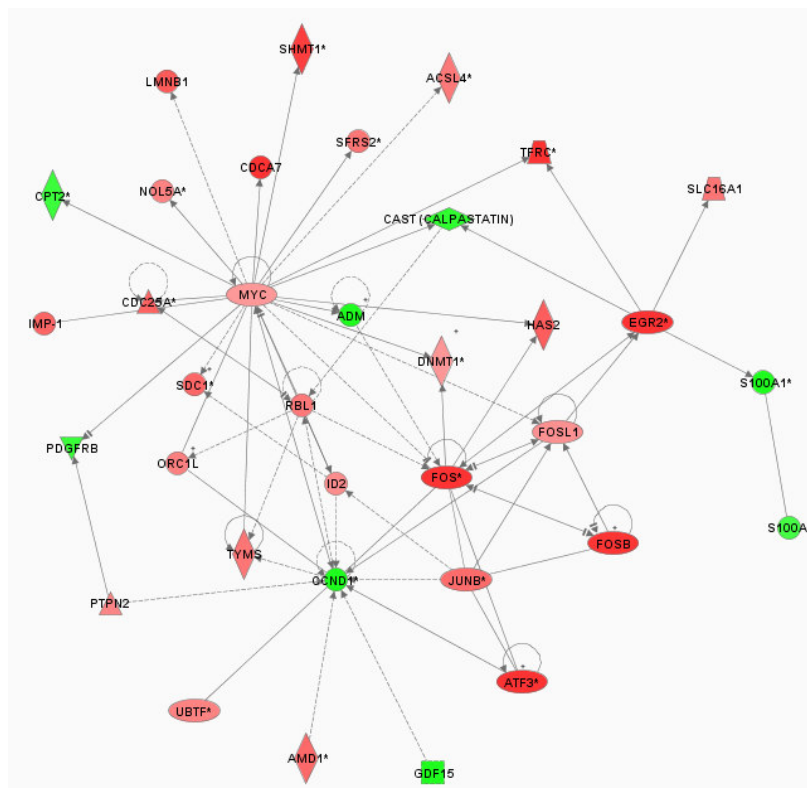


Figura 4.11. Rede gênica 2, modulada em 4 horas (inflamação crescimento)



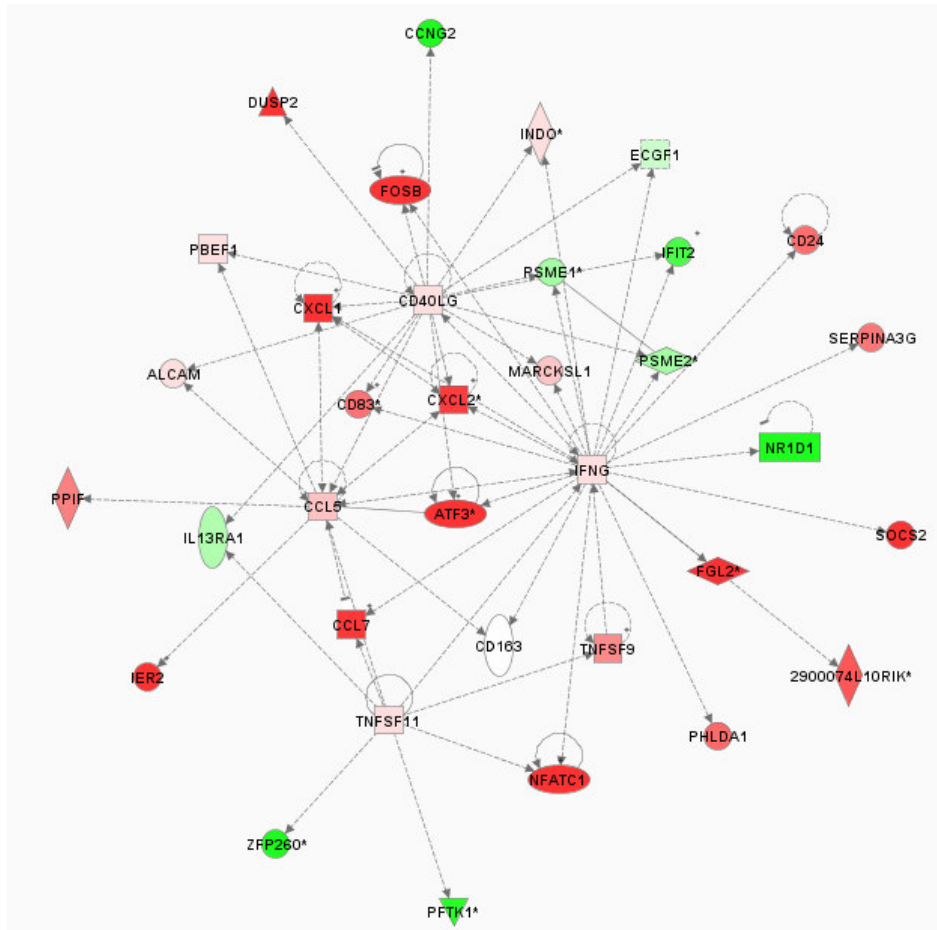


Figura 4.13. Rede gênica 4, modulada em 4 horas (morte celular, interação e sinalização célula-célula).

Outros genes aumentados nessa rede são:

- *ccl7* (*chemokine (C-C motif) ligand 7*) que codifica para uma quimiocina que atrai macrófagos durante o processo inflamatório e metástase. Esta proteína *in vivo* é substrato da matriz da metaloproteinase 2, uma enzima que degrada componentes da matriz extracelular.
- *fgl2* (*fibrinogen-like 2*) codifica para uma proteína similar a cadeia beta e gama do fibrinogênio. O FGL2 forma um complexo tetramérico que é estabilizado por ligações dissulfeto. Estudos revelam que apoptoses em neutrófilos diminuem a expressão deste gene (KOBAYASHI *et. al.*, 2003).







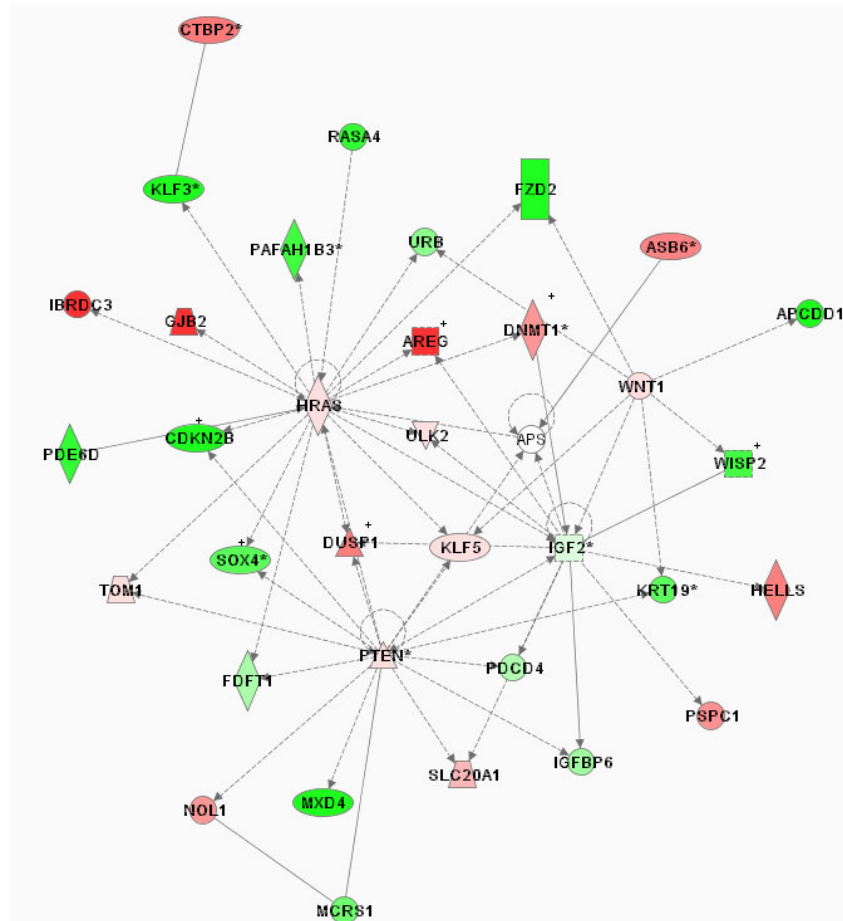


Figura 4.15. Rede gênica 6, modulada em 4 horas (câncer e doença do sistema reprodutivo).

A sexta rede gênica estudada em 4 horas está representada na figura 4.15. Nela, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *dusp1*, *areg* e *ibrc3*. Foram identificados alguns genes com expressão diminuída em 4 horas na rede 6 como, o gene *wisp2* (inducible signaling pathway protein 2) que codifica para um membro da família da proteína da via de sinalização induzida por WNT1. WNT1 é rica em cisteína e sinalização de glicosilação medeia diversos processos de desenvolvimento. Esta proteína está envolvida nos processos de adesão celular, transdução de sinal e regulação do crescimento celular. O gene *sox4/sry* (sex determining region Y)-box 4 que codifica para uma proteína que age como fator transcricional envolvida no proces-

so de desenvolvimento embrionário. Esta proteína pode agir na via da apoptose levando a morte celular.

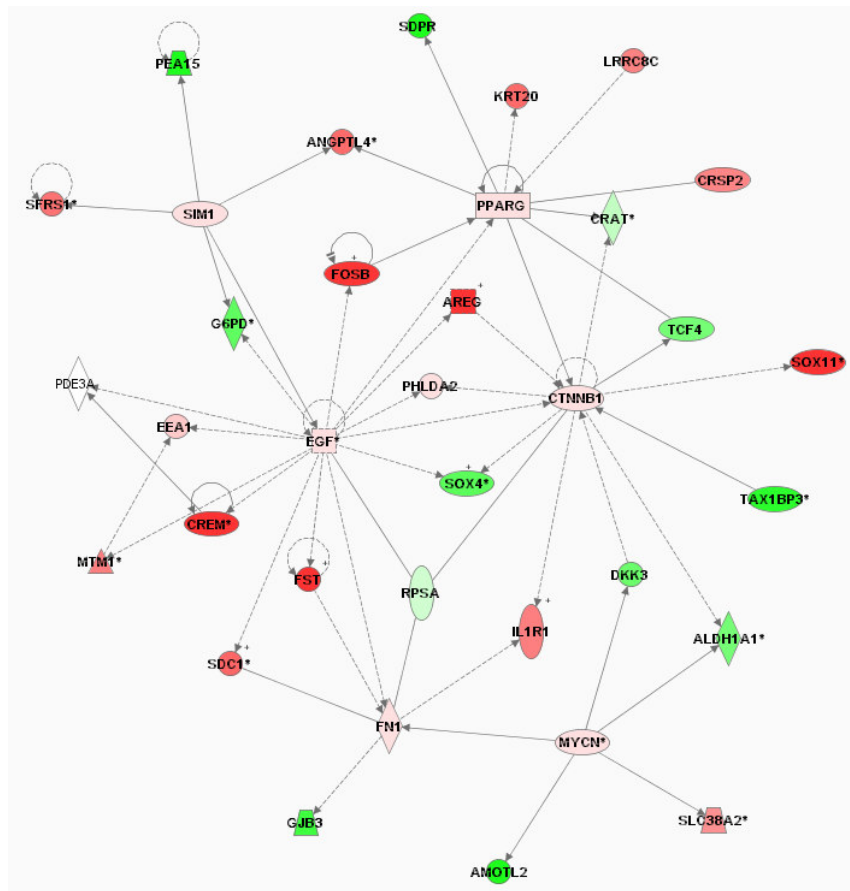


Figura 4.16. Rede gênica 7, modulada em 4 horas (replicação do DNA, recombinação e reparo).

A rede 7, representada na figura 4.16, é outra rede que contém o gene *fosb*. Na rede acima é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *crem*, *fosb*, *areg* e *fst* (*follistatin*) que codifica para uma proteína que regula negativamente a secreção do hormônio FSH. Esta proteína está envolvida no crescimento celular e diferenciação.

Na rede 8, representada na figura 4.17, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *ier2*, *il13ra2*, *il11* (que codifica uma proteína membro da família gp130 de citocinas). Esta citocina juntamente com as células T estimula a produção de imunoglobulinas em células B, participando também do processo inflamatório. Foram identificados alguns genes com expressão diminuída em 4 horas na rede 8 como *bcl2l1*, *eno*, *elh3* (*ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)*). Essa rede apresenta alguns genes de resposta imune.

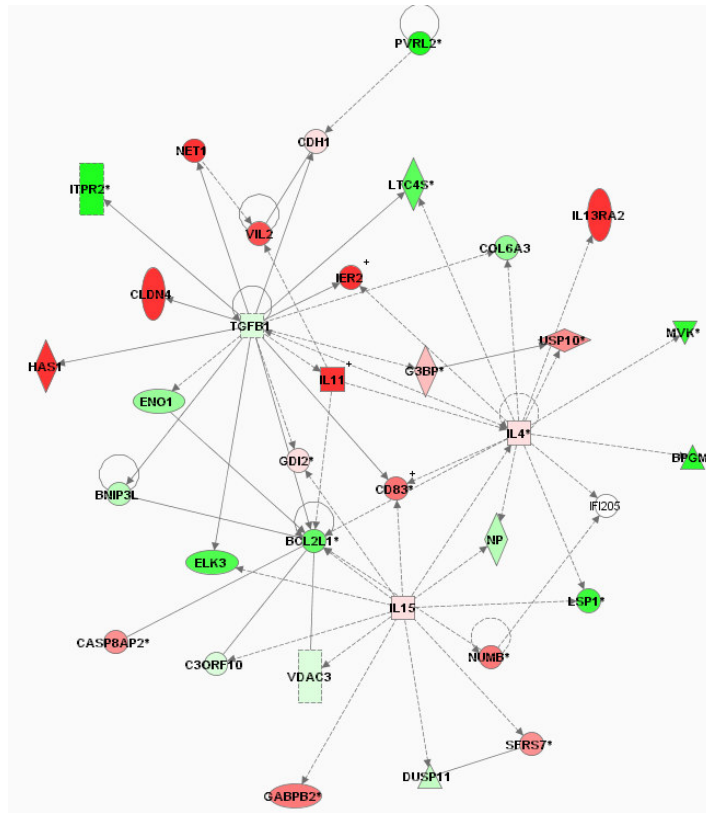


Figura 4.17. Rede gênica 8, modulada em 4 horas (morfologia celular e sistema imune).

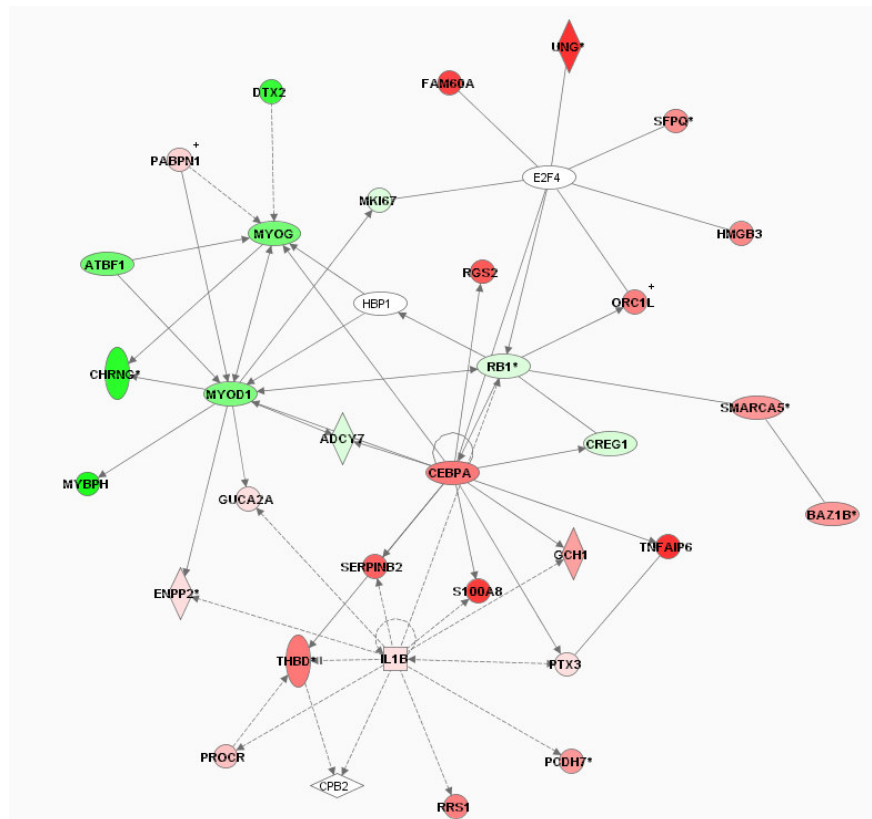


Figura 4.18. Rede gênica 9, modulada em 4 horas (desenvol. celular, sistema muscular e esquelético).

A rede 9, encontrada em 4 horas, está representada na figura 4.18. É possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *s100a8* (*s100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)*), que codifica para uma proteína da família das *s100* que contém domínios ligantes para o íon cálcio. Esta proteína está envolvida em vários processos celulares como progressão do ciclo celular e diferenciação, participando do processo inflamatório e também agindo como inibidora das caseínas quinases. Esta proteína mostrou ser importante nos eventos infecciosos da malária (JARAMILLO *et. al.*, 2004). O gene *cebpa* (*ccat/enhancer binding protein (c/ebp), alpha*) que codifica uma proteína que se liga a promotor e modula a expressão do gene que codifica a leptina, uma proteína importante na homeostase. Esta proteína pode interagir com CDK2 e CDK4, inibindo estas quinases e causando falha no crescimento das células. O gene *tnfaip6* (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*) que codifica para uma proteína secretória contendo um domínio ligante a hialuronano (*hyaluronan*). Esse domínio é conhecido por estar envolvida na estabilidade da matriz e migração celular. Esta proteína forma um complexo estável com o inibidor I alfa I, aumentando a atividade inibitória de uma serina protease que é importante na rede de proteases associadas com a inflamação. A expressão deste gene pode ser induzida por TNF-alfa e interleucina 1, podendo também ser induzida por estímulos mecânicos nas células do músculo liso vascular e podendo ser correlacionado com a síntese de proteoglicanos.

Foram identificados alguns genes com expressão diminuída em 4 horas na rede 9 como o gene *myod* (*myogenin (myogenic factor 4)*) e *myod1* (*myogenic differentiation 1*), que codificam proteínas que regulam a diferenciação das células musculares bloqueando o ciclo celular, sendo um pré requisito para iniciação miogênica. Estas proteínas estão envolvidas na regeneração muscular.

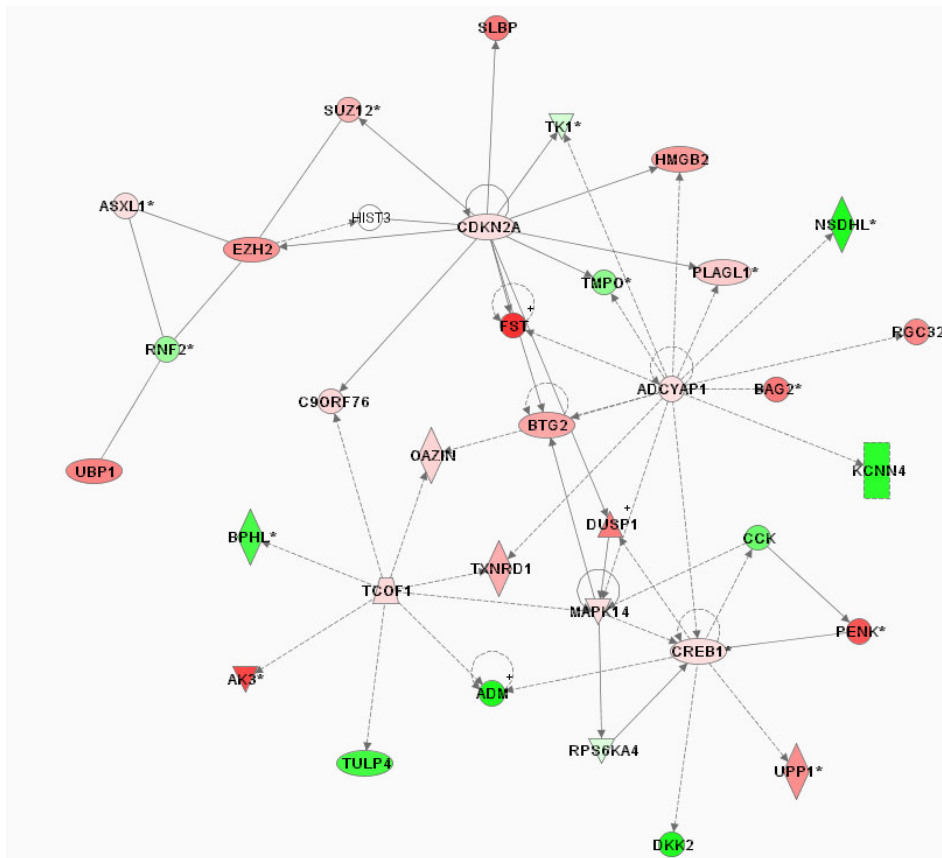


Figura 4.19. Rede gênica 10, modulada em 4 horas (câncer, morfologia celular).

Na rede 10, representada na figura 4.19, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *penk*, *ak3*, *fst* e *dusp1*. Genes diminuídos como *tulp4*, *kcnn4*, *nsdhl*, *bphl* e *dkk2*. As maiores mudanças são em genes mais periféricos a rede, genes centrais sofrem pouca modulação e em geral essas mudanças são relativamente pequenas.

A rede 11 selecionada em 4 horas, a última a ser selecionada pelo programa, apresenta claramente um padrão de modulação menos consistente, representado pelas tonalidades mais claras de expressão diferencial, sendo que os genes centrais são menos modulados.

### 4.5.3 Resultados dos genes selecionados em 24 horas de infecção

Analisando somente os dados de 24 horas de infecção, foram selecionadas 11 redes gênicas que se encontravam sobre-representadas, com confiabilidade estatística, cujos genes constituintes e as funções mais comuns estão representadas na tabela 4.9. Esse número representa um

conjunto selecionado dentre as redes com confiabilidade estatística, pois se fosse utilizado o mesmo critério de seleção empregado para 30 minutos e 4 horas, teríamos selecionado 25 redes. As onze redes escolhidas são as mais consistentes.

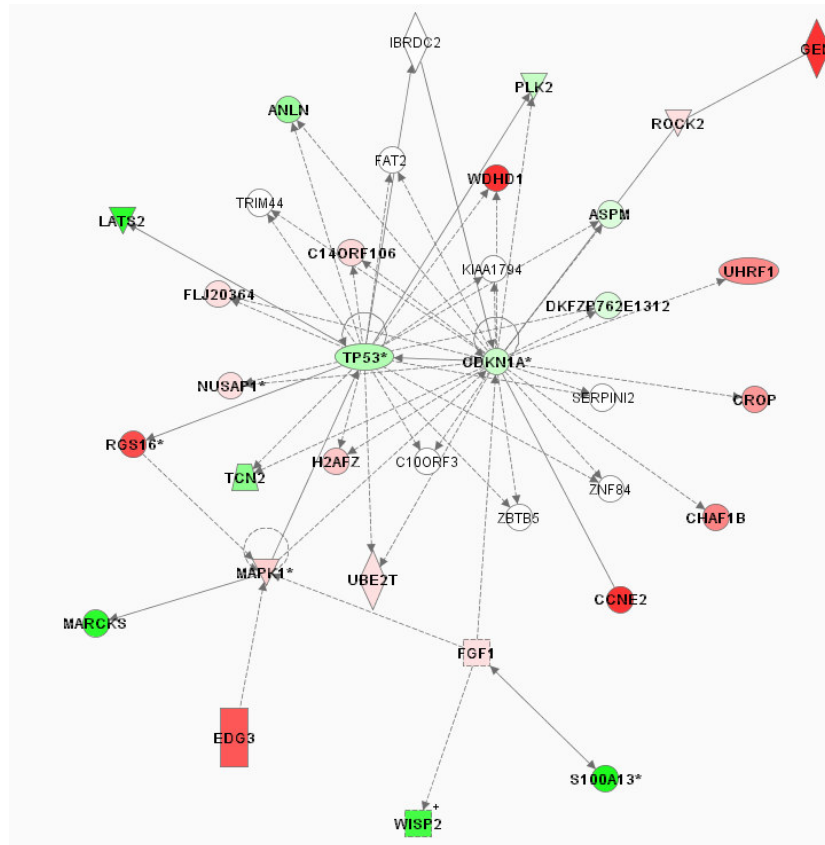


Figura 4.20. Rede gênica 11, modulada em 4 horas (ciclo celular, movimento celular).

Estas redes apresentam diversos genes que as conectam conforme pode ser visto esquematicamente na figura 4.21.

Verificamos que as redes que contém um número maior de genes relacionados são as redes nove e treze, contendo os genes *btrc*, *cd83*, *tap1* e *g3bp2*, as redes um e dezesseis, contendo os genes *fzd2*, *smad6* e *tgfb1*, as redes três e dezessete contendo os genes *abcb1b*, *prc1* e *tp53* e as redes seis e dezenove contendo os genes *cx3cl1*, *gas6* e *il1rl1*.

Tabela 4.9. Redes gênicas mais afetadas no tempo de 24 horas de infecção

ID	Genes	Score	Focus Genes	Top Functions
1	↑ACPP, ↑BHLHB2, ↑BMP2*, ↑CAP1, ↓CLDN4, ↓CNN2, ↓COL11A1, ↓COL3A1*, ↓COL6A2, ↓COL6A3, ↓ECGF1, ↑FOXCl, ↑FZD2, ↓G3BP*, ↑HAS1, ↑HBEF, ↓HMOX1, ↓LTC4S*, ↑MAX, ↑MCPT1*, ↑MXD4, ↓PDLIM7*, ↑PRSS11, ↓SGPP1, ↓SKI, ↓SMAD1*, ↓SMAD6, ↓SMAD7, ↓TAX1BP3*, ↑TGFBI, ↑TGFBI2, ↑TGFBI3*, ↑TIMP1*, ↑TM4SF2, ↑TOB1*	36	35	Cellular Development, Connective Tissue Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Function
2	↓ACOX1*, ↓ADIPOQ, ↓ADORA2B*, ↓ANG, ↓CDKN3, ↑CHGB*, ↓CPT1A, ↓CSNK2A1*, ↓CTCF, ↓END2, ↑ENPP2*, ↑EXO1, ↓HSPA1B, ↓IDH1, ↑IL6, ↑INDO*, ↑KIAA0101*, ↓KIF1C1, ↑LIG1*, ↓LPL*, ↓LRRRCB, ↓LYZ*, ↑MSR1, ↓MYL2, ↑NPY, ↑ORM1*, ↓OSBPL1A*, ↑POLD1*, ↑POLD2, ↓POLDIP3*, ↑PTGER3*, ↓STOM*, ↓TIRAP, ↓TXNIP*, ↑WARS*	36	35	Cardiovascular Disease, Metabolic Disease, Lipid Metabolism
3	↑ABC8B*, ↓APOBEC2*, ↓ARL6IP, ↓BLZF1, ↓CCNL2, ↓CKAP2, ↓COMT, ↓DDR1, ↓DKFZP762E1312, ↓FAM3C*, ↑GART, ↑GAS2*, ↓GSTM1, ↓HIST1H1C, ↓LATS2, ↓MB*, ↑NASP, ↑NBR1*, ↓NUSAP1*, ↓PCBP4, ↓PDCD6IP*, ↓PEG3*, ↓PRC1, ↓SNRK, ↓STK6, ↓STRN*, ↓STRN3, ↓TAF1C, ↑TBXAS1*, ↓TCN2, ↓THBS2, ↓TP53*, ↓UBE2B, ↓UBE2D2*, ↑WDHD1	36	35	Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cancer
4	↑ASK, ↑BAAT, ↑CCNE2, ↓CDKN1A*, ↓CDKN1B*, ↓CDT1*, ↑CHAF1B, ↓CROP, ↓DCN, ↓DMTF1*, ↑GEM, ↓GHR*, ↑HAT1*, ↓KPN4, ↓MCM2, ↓MCM3*, ↓MCM4, ↓MCM5*, ↑MCM7, ↓MYST2*, ↓NAB1, ↓NAB2, ↓NUP50*, ↓ORC1L, ↓ORC4L*, ↓ORC5L*, ↓PCAF*, ↓PSAP*, ↓PTX3, ↓ROCK1*, ↑TNFAIP6, ↑TYMS, ↑UCHL1, ↑UHRF1, ↑XP01*	36	35	DNA Replication, Recombination, and Repair, Cancer, Cell Cycle
5	↑ADAMT51, ↓BTC, ↓CCL13, ↓CDKN2D, ↓CSPG2, ↓CTGF, ↓CXCL1, ↓CXCL2*, ↓CXCL10, ↓EZH2, ↓F3, ↑F7*, ↓FBLN1*, ↓FGF2, ↓GLI1*, ↓GLG1*, ↓ID3, ↑ITGA5, ↓MEDX2, ↓NRP1*, ↑PCGF2*, ↓PCGF4, ↓PTN, ↑PTPRZ1*, ↓RECK, ↓RNF2*, ↓SDC1*, ↓SDC4, ↓SHC1, ↓SPP1, ↓SUZ12*, ↑TFPI2, ↑TIMP2*, ↑VEGFC, ↓YY1*	36	35	Cellular Movement, Cancer, Cellular Growth and Proliferation
6	↓APL2*, ↓BAD*, ↓CCRN4L*, ↓CLOCK, ↓CRY1*, ↓CSNK1D*, ↓CSNK1E, ↑CTF1*, ↑CX3CL1*, ↓DBP, ↓ELF1*, ↓FAS, ↓GABPA*, ↓GAS6, ↓GTF3C2, ↑IL1RL1*, ↓KIAA0310, ↓LTBR, ↓MAP4K3*, ↓MAP4K4*, ↑MAPK8*, ↓MAPKAPK2*, ↑NFKB2*, ↓PAK4, ↓PEA15, ↓PLK3, ↓PPP3CA, ↓RHOU*, ↓ROR2*, ↓SH3MD2*, ↓SLC10A1*, ↓SOD3, ↓SSB, ↑TNIP1, ↓ZHX1*	36	35	Behavior, Nervous System Development and Function, Amino Acid Metabolism
7	↓BCL2L1*, ↓CAST (CALPASTATIN), ↑CCL5, ↑CISH*, ↑CLEC2D, ↓CRKL*, ↓CSF2, ↓CSF3, ↑FCER1G*, ↓GAB1*, ↑IFNAR2*, ↑IL11, ↓IL10RB, ↑IL13RA2, ↑IL17R*, ↓IL6ST*, ↓KITLG, ↓MARK3*, ↑NCR1, ↓PIAS3*, ↑PIM1*, ↑PLSCR1, ↓PPP3CB, ↑REG1B*, ↓RP56KB1*, ↓SNAP23, ↓SOCS2, ↓SOCS3*, ↓STAT1, ↓STAT3*, ↓STAT6, ↓STAT5A*, ↑TNFRSF1A*, ↓TNFRSF1B, ↓ZNF207	36	35	Inflammatory Disease, Hematological System Development and Function, Cellular Development
8	↓ADAM10, ↑AK2, ↑ATF3*, ↓BCL6, ↓BIN1*, ↓BMYC, ↓CCND1*, ↓CDH2, ↓CDKN1C, ↓ETNND1*, ↓DNM1*, ↓DUSP9*, ↑FTS*, ↑GAP43, ↓GDF15, ↓GRN, ↑HK2*, ↑IQGAP1*, ↓LRFRIP1*, ↓MYO10, ↓NGFB, ↓NRAS, ↑PCK1, ↓PDPK1*, ↓PRKCE*, ↓PRKCI, ↓RARG, ↓RIN2, ↑RIT2*, ↓RRM2*, ↓SLP1*, ↓SMPD1*, ↓SORBS1*, ↓VCL*, ↓WNT5A	36	35	Cell Morphology, Cellular Growth and Proliferation, Cancer
9	↓ABHD5, ↓ADFP, ↓BIRC3, ↓BTRC*, ↓BYSL*, ↓CD14, ↓CD83*, ↓CLDN1*, ↓COMM7, ↓F11R, ↓FBXW11*, ↓G3BP2*, ↓GNA12*, ↓HDAC6, ↓HDAC7A, ↓IKBK*, ↓KRT18*, ↓MPDZ, ↓NCOR1, ↑NFKB1, ↓NFKBIA, ↓NUMB*, ↑PLEKHA1*, ↓PPP2CB, ↓PVR, ↓PVR2*, ↓RELB*, ↓SIRT2, ↓SNAI1, ↓TANK, ↓TAP1*, ↓TAPBP*, ↓TBL1XR1, ↑TJP1*, ↑XDH*	36	35	Gene Expression, Hematological Disease, Organismal Injury and Abnormalities
10	↑APRT*, ↑CAD*, ↓CEBPB, ↓CRSP3, ↓CRSP8, ↓CYP1B1*, ↓EBF, ↑EGR1*, ↓ETS1*, ↑ETV4*, ↓FGF7, ↑GATA2*, ↓GUSB, ↓ID1, ↓IFI16*, ↑IGFBP3*, ↑JUNB*, ↓LMO2*, ↑MMP3, ↓NFE2L1*, ↑PENK*, ↓PITX1, ↓PLAA*, ↓PLAT, ↑PLP1*, ↑PTGER4, ↑PTGS2, ↓RUNX1, ↓RUNX2*, ↓SECB1, ↑SPRR1B*, ↑TCF3, ↑TNFRSF11B, ↑UPP1*, ↓ZFPM1	36	35	Gene Expression, Cellular Development, Hematological System Development and Function
11	↓ACSL1, ↓ADM, ↓ANKA1*, ↓ARHGAP5, ↓BAK1, ↓BID, ↓BPGM, ↓CA3, ↓DCTN2*, ↓EIF4A2, ↓EIF4G1*, ↓EIF4G3, ↑FKBP4*, ↓GPX3, ↓HMGCR*, ↓HSPA1A, ↑MAT2A, ↓MCRS1, ↓MEF2A*, ↓MEF2D, ↓MFN1*, ↓MKNK2*, ↑NDEL1*, ↓PAFAH1B1, ↓PAFAH1B3*, ↓PAPOLA*, ↓PDCD4, ↓PHYH, ↓PTEN*, ↓RANGAP1*, ↓RHOD, ↓SEC23A*, ↓SDX4*, ↓TNFAIP1*, ↑UF3B*	36	35	Protein Synthesis, Cancer, Cell Death

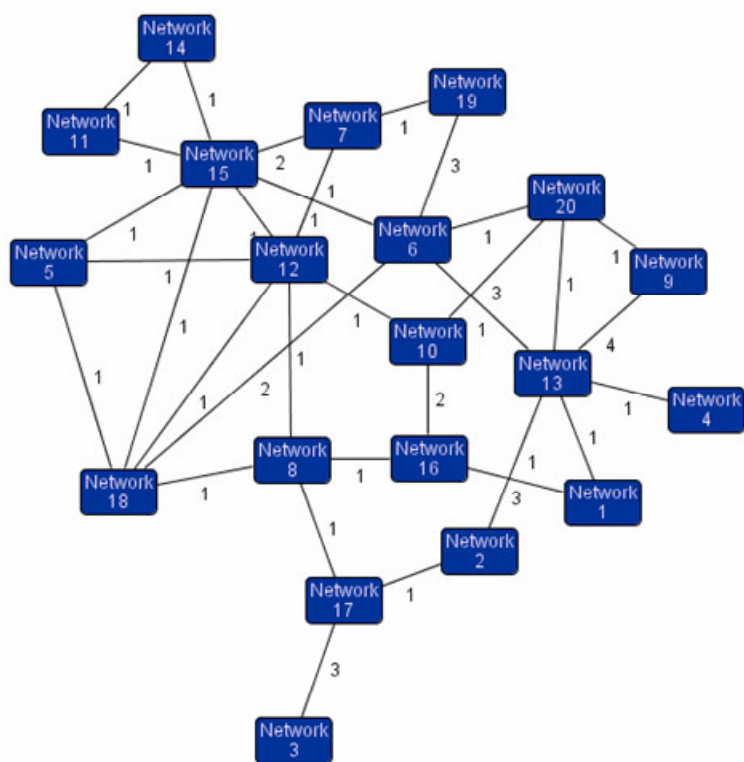


Figura 4.21. Representação esquemática dos genes conectando as redes de 24 horas.







induz a formação de cartilagem e diferenciação de células cardíacas. Foi verificado um aumento na apoptose associados a esta proteína, porem em células musculares esta proteína estimula a expressão de moléculas anti-apoptóticas.

Foram identificados alguns genes com expressão diminuída em 24 horas na rede 1 como, o gene *tgfb2* (*transforming growth factor, beta 2*) que codifica para uma citocina que atua na regulação da diferenciação celular e agindo também no desenvolvimento embrionário. O gene *tgfb3* (*transforming growth factor, beta 3*) que codifica uma proteína que controla a interação entre as células mesenquimais e epiteliais, regulando a diferenciação celular e proliferação. Esta proteína promove o crescimento das células mesenquimais, mas age como inibidora potente do crescimento para muitos outros tipos celulares. Esta proteína também é chave na inibição da inflamação. O gene *sma7* (*smad, mothers against DPP homolog 7*) codifica uma proteína inibitória da sinalização intracelular de TGF $\beta$ 1 no processo inflamatório.

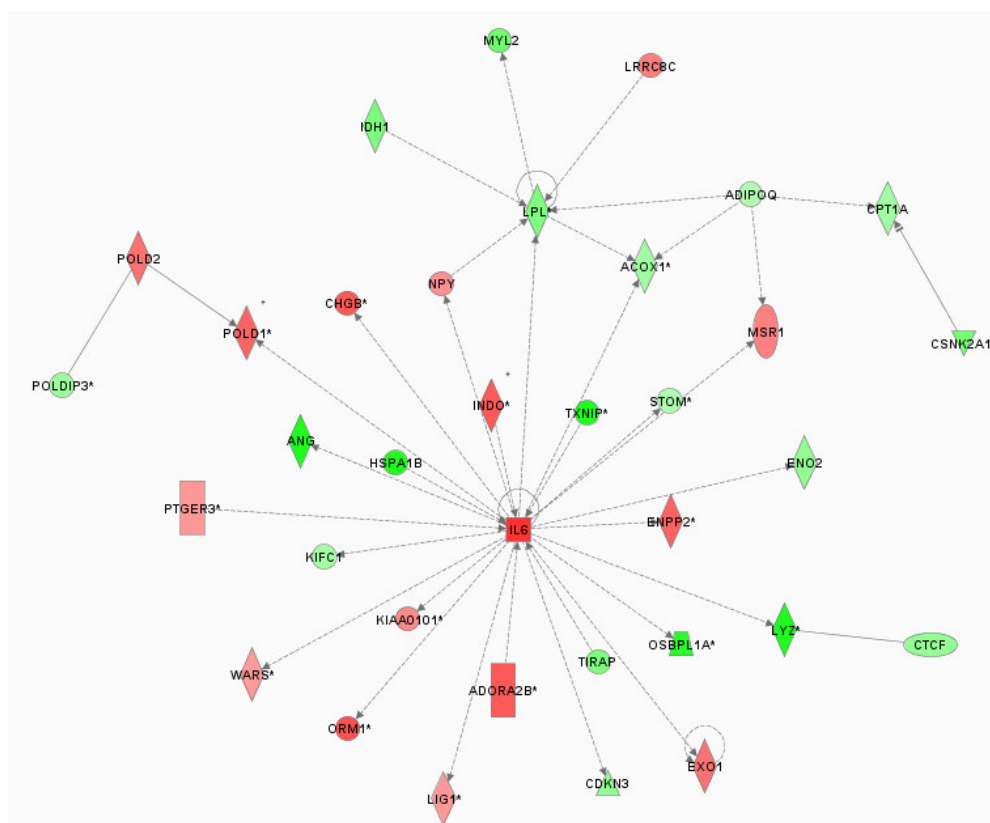


Figura 4.23. Rede gênica 2, modulada em 24 horas (metabolismo de lipídeos, doença cardiovascular).

Na rede 2, representada na figura 4.23, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *il6*, *adora2b*, *indo* - gene de interferon-gama que tem um efeito antiproliferativo

em muitas células tumorais e inibe patógenos intracelulares como *T. gondii* e *Chlamydia* ao induzir a síntese de *indoleamina 2,3-dioxigenase*, a qual catalisa a degradação de aminoácidos essenciais como L-triptofano. O gene *orm1* (*orosomucoide 1*) codifica para uma proteína chave durante a fase aguda da inflamação. As funções específicas para esta proteína não são bem determinadas, embora esteja envolvida em aspectos imunossupressores.

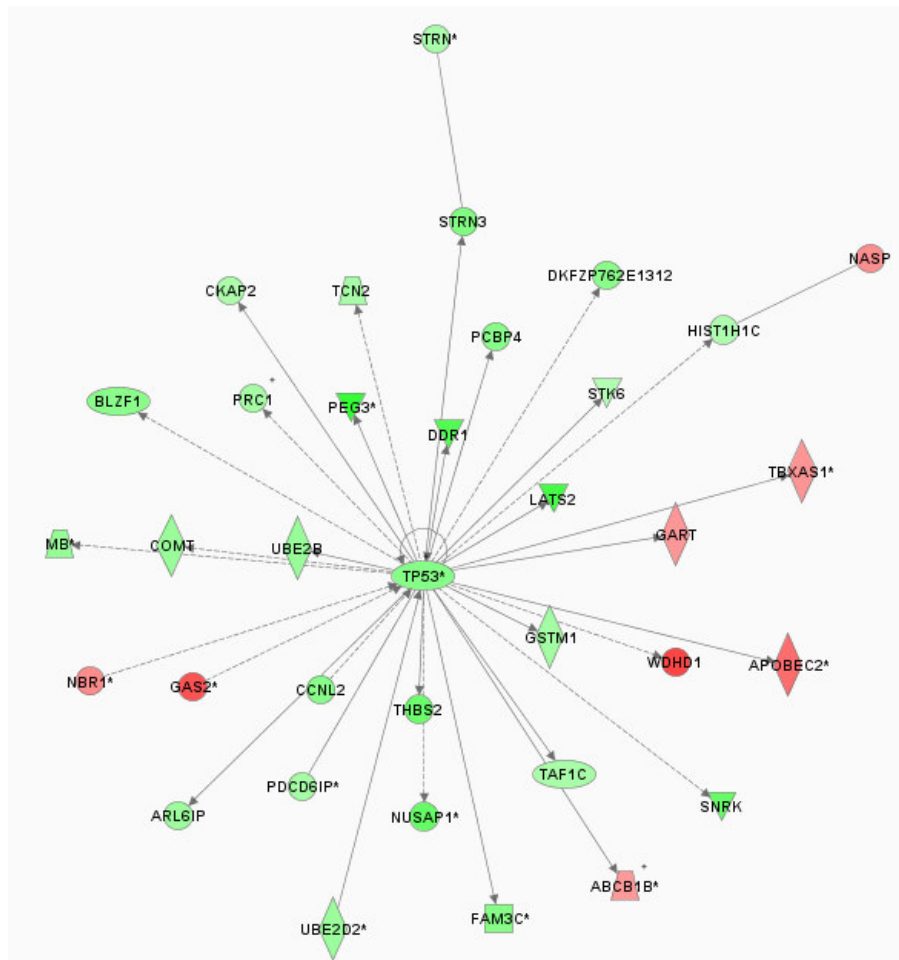


Figura 4.24. Rede gênica 3, modulada em 24 horas (replicação do DNA, recombinação e reparo).

Na rede 3 representada na figura 4.24, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *wdhd1*, *apobec2*, *gas2* (*growth arrest-specific 2*) que codifica para uma proteína que é substrato para a caspase-3, estando envolvida na regulação dos microfilamentos e a forma da célula durante a apoptose. Esta proteína modula a suscetibilidade da célula durante o processo de apoptose dependente de TP53 por inibir a atividade da calpaína.

Verifica-se nesta rede que grande parte dos genes está diminuída, sendo o gene central desta rede o *tp53* (*Tumor protein p53*), uma proteína nuclear que desempenha um papel essencial na regulação do ciclo celular, especificamente na transição da fase G0 para G1. Ela é encontrada em baixos níveis em células normais, entretanto, numa variedade de linhagens de células transformadas, é vista em grande quantidade. TP53 contém domínios de ligação ao DNA podendo, desta forma, ativar a expressão de genes, inibindo o crescimento, tendo assim, sua função de supressor de tumor. Muitos trabalhos demonstram seu papel na regulação da apoptose celular. Trabalhos envolvendo camundongos mutantes para este gene demonstram uma inibição significativa no processo de apoptose celular (AMSON *et. al.*, 2000).

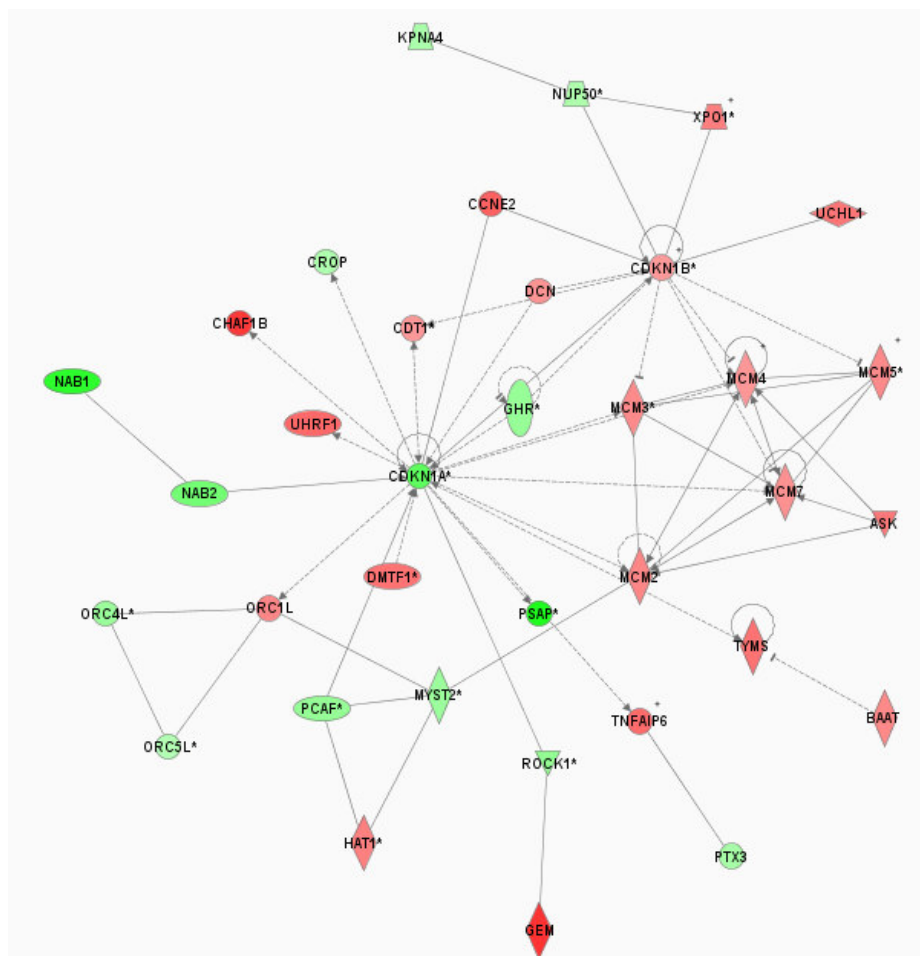


Figura 4.25. Rede gênica 4, modulada em 24 horas (replicação do DNA, recombinação e reparo).

Na rede 4, representada na figura 4.25, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *gem*, *cdkn1b*, *ccne2*, *mcm2*, *mcm3*, *mcm4*, *mcm5* e *mcm7*. As proteínas Mcm(s) são prote-

ínas essenciais para a iniciação da replicação em eucariotos. Formam um complexo hexamérico chave para o componente do complexo pré-RC e pode estar envolvido na formação da forquilha de replicação e no recrutamento de outras proteínas relacionadas com a replicação de DNA. MCM2, MCM6 e MCM7 promovem a atividade da DNA helicase. O gene central desta rede é a CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) (*p21, Cip1*) que codifica para um gene inibidor da quinase dependente de ciclina, inibindo a atividade do complexo CDK2 ou CDK4 regulando a progressão do ciclo celular na fase G1. Este gene é altamente regulado por P53 e pode interagir com PCNA (proliferating cell nuclear antigen), um fator acessório para DNA polimerase, que age como reguladora da replicação e no reparo do DNA na fase S. Esta proteína é especialmente clivada por CASP3 ativando CDK2, sendo um instrumento na execução da ativação da via de morte celular programada, sendo identificada nesta rede como fortemente diminuída.

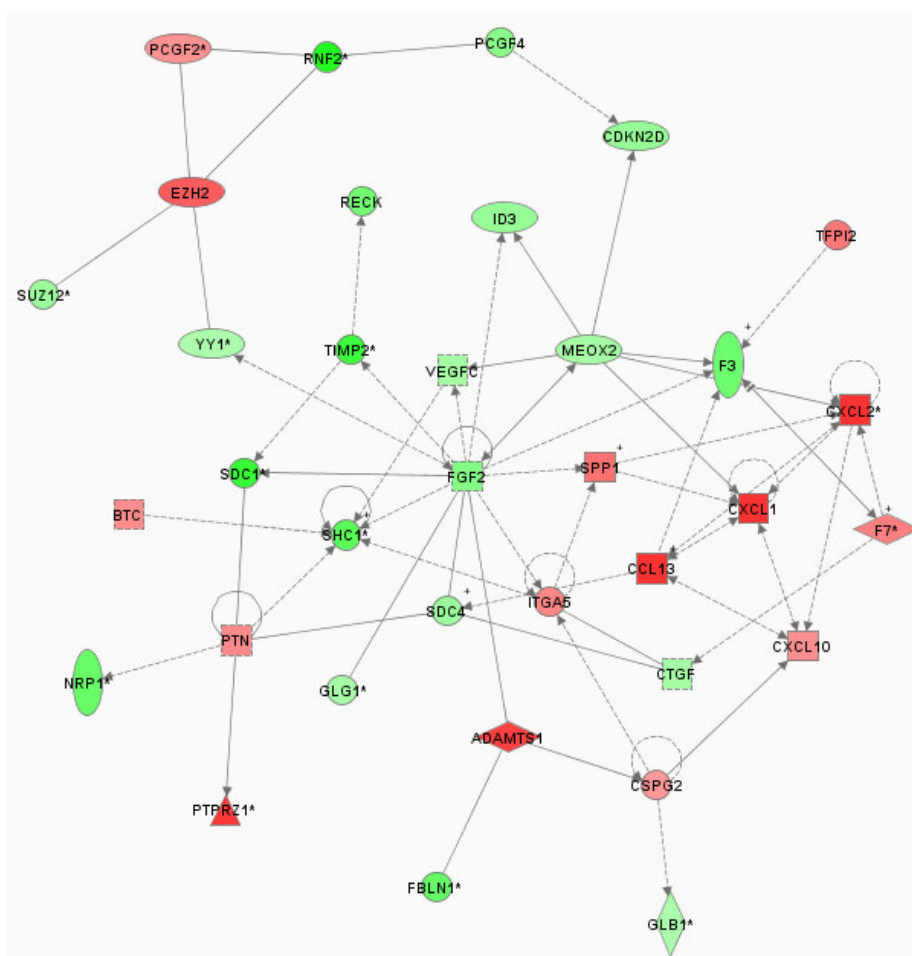


Figura 4.26. Rede gênica 5, modulada em 24 horas (movimento celular, crescimento e proliferação).

Na rede representada na figura 4.26, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *ccl13*, *cxcl1* e *cxcl2*, mas o gene central que tem maior conectividade é o gene FGF2 (*fibroblast growth factor 2 (basic)*) codifica para um gene da família das FGFs que são ligantes a heparina e possuem atividade angiogênica e mitótica. Esta proteína tem sido implicada em vários processos celulares como crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso. As bFGF em tecido cardíaco, tem sido localizadas em associação com o núcleo, matriz extracelular e discos intercalares dos cardiomiócitos. Em estudos com parasitas intracelulares, mostram que cistos do protozoário *Sarcocystis* em cardiomiócitos aparecem conectados diretamente com a junção especializada da célula hospedeira, proporcionada por bFGF entre a parede do cisto e os discos intercalares de miócitos. Assim, sugerindo uma nova função para bFGF no contexto da invasão de parasitas (KARDAMI, 1990).

Este gene em nossos dados apresenta uma diminuição em 24 horas, como também os genes *shc1* (*shc (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1*) sendo envolvido na ativação de MAP quinases e age na sinalização de IL-6. Esta proteína revelou estar envolvida também no rearranjo do citoesqueleto de fibronectina (LAI & PAWSON, 2000). O gene *sdc1* (*syndecan 1*) que codifica para uma proteína da família dos sindecanos proteoglicanos. Os sindecanos estão envolvidos na ligação de células, sinalização celular e organização do citoesqueleto. Esta proteína participa na proliferação celular, migração de células e interações da matriz extracelular via receptor de proteínas extracelular. O gene *timp* (*metallopeptidase inhibitor 2*) que codifica para uma proteína da família das proteínas inibitórias da matriz de metaloproteínas, um grupo de peptidases envolvidas na degradação da matriz extracelular. Esta enzima age diretamente na supressão da proliferação de células endoteliais. Sendo esta proteína, crítica para a manutenção da homeostase do tecido na inibição da proliferação de tecidos em resposta aos fatores angiogênicos, remodelando a matriz extracelular pela atividade inibitória de proteases.

O gene *meox2* (*mesenchyme homeobox 2*) codifica para uma proteína com atividade de fator transcricional. Esta proteína está envolvida na diferenciação celular e morfologia da célula. Esta proteína juntamente com MEOX1 são importantes no desenvolvimento do esqueleto axial e músculo esquelético. O gene *f3* (*coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)*) que codifica para uma glicoproteína de superfície celular. Este fator age na iniciação da cascata de coagulação do sangue e funciona como um receptor de alta afinidade para o fator VII de coagulação. O gene

*adamts1* (*adam metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1*) que está associado a vários processos inflamatórios, crescimento, fertilidade e morfologia. Esta proteína participa da regulação negativa da proliferação.

O gene *rnf2* (*ring finger protein 2*) codifica para uma proteína PcG. O grupo das proteínas *Polycomb group* (PcG) formam um complexo multiprotéico que é importante para a repressão da transcrição de vários genes envolvidos no desenvolvimento e proliferação celular. Esta proteína pode ser encontrada interagindo com *huntingtin interacting protein 2* (HIP2), uma enzima de ubiquitina conjugadora processando a atividade da ubiquitina ligase.

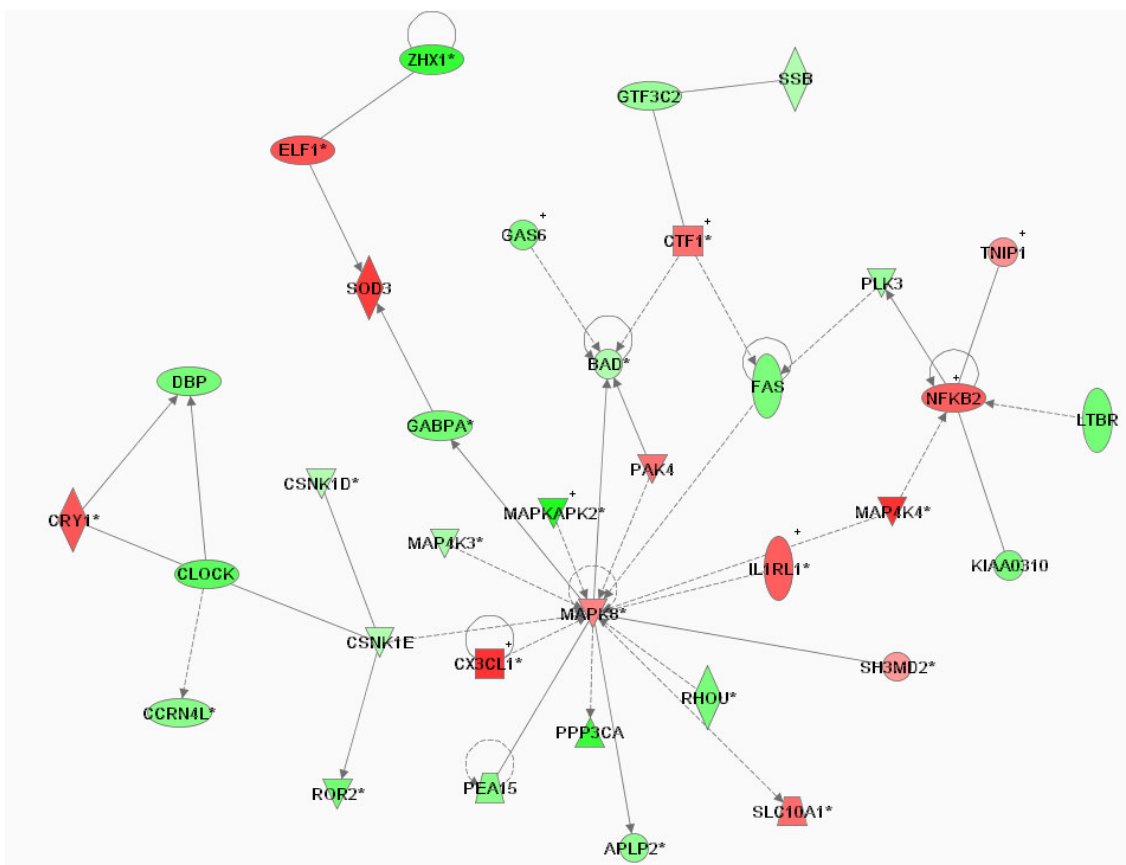


Figura 4.27. Rede gênica 6, em 24 horas (desenv. sistema nervoso e metabol. de aminoácidos).

Na figura 4.27, está representada a sexta rede encontrada em 24 horas. Nela, é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *il1rl1*, *nfkb2*, *sod3* (*superoxide dismutase 3, extracellular*) que codifica para uma enzima que cataliza a quebra da ligação do superóxido do peróxido de hidrogênio, regulando os níveis de ROS, moléculas de superóxidos reativas produ-

zidas pela mitocôndria. As enzimas SODs regulam o estresse oxidativo das células. A super-expressão desta enzima em *S. cerevisiae* e *Drosophila* podem reduzir o perigo oxidativo, mas o mecanismo não é muito claro. Estudos revelaram que vacinas produzidas com fragmentos desta proteína podem conferir proteção imunológica em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (LOVERDE *et. al.*, 2004).

O gene *cx3cl1* (*chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*) que codifica para uma quimiocina que atrai leucócitos e aumenta a ativação da MAPK8. Esta quimiocina está envolvida na adesão, morte celular, excitose, crescimento e migração celular. Em nossos dados *map4k4* e *mapk8* estão aumentadas, sendo *mapk8* um elemento central desta rede. Outras Map quinases estão diminuídas como *map4k3* e *mapkapk2* (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*), a qual, juntamente com *p38 map quinase*, está envolvida no processo celular de resposta inflamatória e estresse. Estudos evidenciaram o papel desta enzima no processo de resposta imunológica e produção de óxido nítrico em camundongos infectados por *Listeria monocytogenes* (LEHNER *et. al.*, 2002). O gene *clock* (*clock homolog*) que codifica para uma proteína reguladora do ciclo circadiano agindo como fator transcricional e o gene *gabpa* também estão diminuídos em 24 horas. *gabpa* (*GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa*) codifica para uma das três subunidades do complexo do fator transcricional ligante GA (guanina –adenina), proteína também envolvida na ativação da expressão da citocromo oxidase. Pouco se conhece a respeito deste gene.

Na figura 4.28 está representada a sétima rede de 24 horas, na qual é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *il11*, *il13ra2*, *ccl5*, *csf3*, *csf2* (*colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)*) que codifica para uma citocina que controla a produção, diferenciação e funções de granulócitos e macrófagos. Mas uma das principais funções desta proteína é a regulação do processo inflamatório e da autoimunidade (FLEETWOOD & HAMILTON, 2005). Estudos em camundongos com vacinas com antígenos GRA4 e SAG1 associados à CSF garantiu proteção de 87% dos camundongos para a toxoplasmose (MEVELEC *et. al.*, 2005).

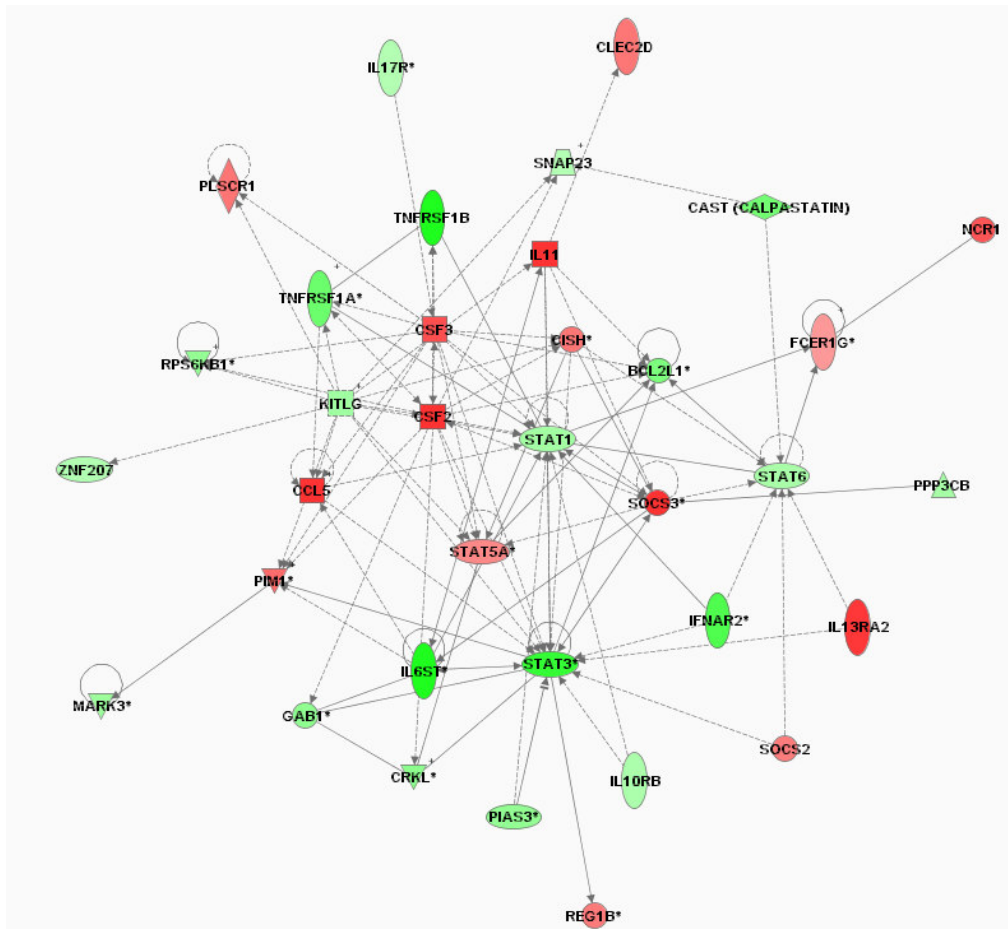


Figura 4.28. Rede gênica 7, modulada em 24 horas (doença inflamatória e desenv. celular).

Foram identificados alguns genes com expressão diminuída em 24 horas na rede 7 como, *stat3* (*Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)*) que codifica para proteína membro da família das proteínas STAT. Em resposta a citocinas e fatores de crescimento, elas são fosforiladas por receptores associados a quinases e formam dímeros se dirigindo para o núcleo da célula ativando a transcrição. Esta proteína age em resposta a estímulos e funciona como chave em muitos processos como crescimento celular e apoptose. O gene *il6s1* (*interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)*), que codifica uma proteína que forma parte do complexo do receptor de citocina, foi sugerida como uma proteína crítica na regulação da apoptose em miócitos, com base em estudos com camundongos *knockout*. O gene *ifnar2* (*interferon (alpha, beta and omega) receptor 2*) que codifica uma proteína de membrana do tipo I que forma uma das duas cadeias do receptor de interferon alfa e beta. E os genes *tnfrsf1a* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*) e *tnfrsf1b* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member*



1B) que codificam para membros da família de receptores TNF. Estas proteínas, juntamente com o TNF-receptor 1 formam um heterocomplexo que age recrutando duas proteínas anti-apoptóticas, c-IAP1 e c-IAP2, que processam a atividade da ubiquitina E3 ligase. A função das IAPs na sinalização do receptor de TNF não é bem conhecida, entretanto, c-IAP1 é um potencial indutor da apoptose pela ubiquitinização e degradação do fator 2 associado ao receptor de TNF que desencadeia sinais anti-apoptóticos. Estudos com camundongos *knockout* também sugerem uma função desta proteína protegendo neurônios da apoptose pela estimulação da via antioxidativa.

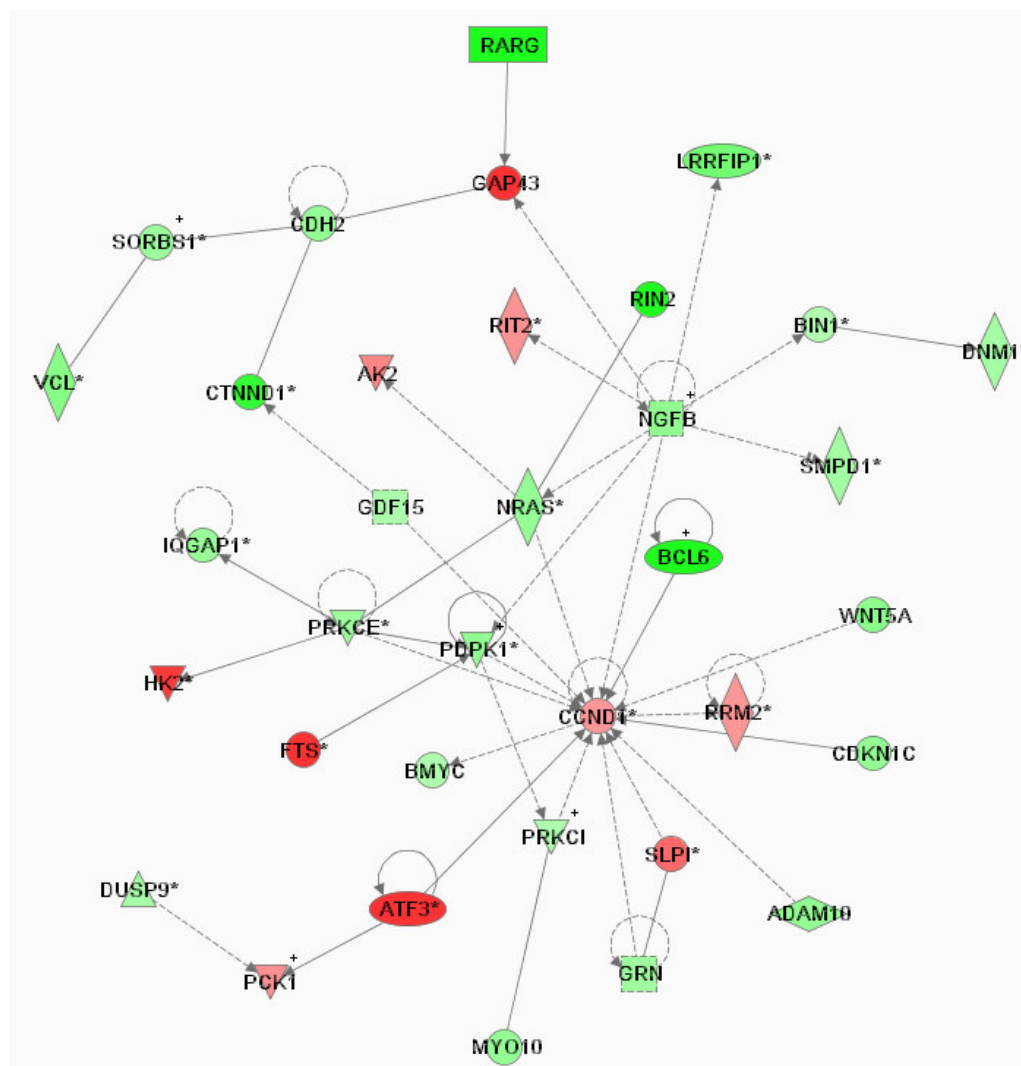


Figura 4.29. Rede gênica 8, modulada em 24 horas (morfologia celular e proliferação e crescimento).

Na figura 4.29 está representada a oitava rede de 24 horas. A maioria dos genes dessa rede está diminuída. É possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *atf3*, *fts*, *gap43* (*growth associated protein 43*), que codifica para uma proteína encontrada em altos níveis durante o crescimento dos cones (células do sistema nervoso) e regeneração de axônios. Os genes principais que diminuíram a expressão nesta rede foram *ngfb* (*nerve growth factor, beta*) que codifica para uma proteína membro da família das NGF-beta. Esta proteína tem atividade de estimular o crescimento de células do sistema nervoso. O gene *ctnnd1* (*catenin (cadherin-associated protein), delta 1*) que codifica para uma proteína que se liga a domínios citoplasmáticos de cadeirinas transmembrana. Muitas cateninas são responsáveis pela sinalização nuclear.

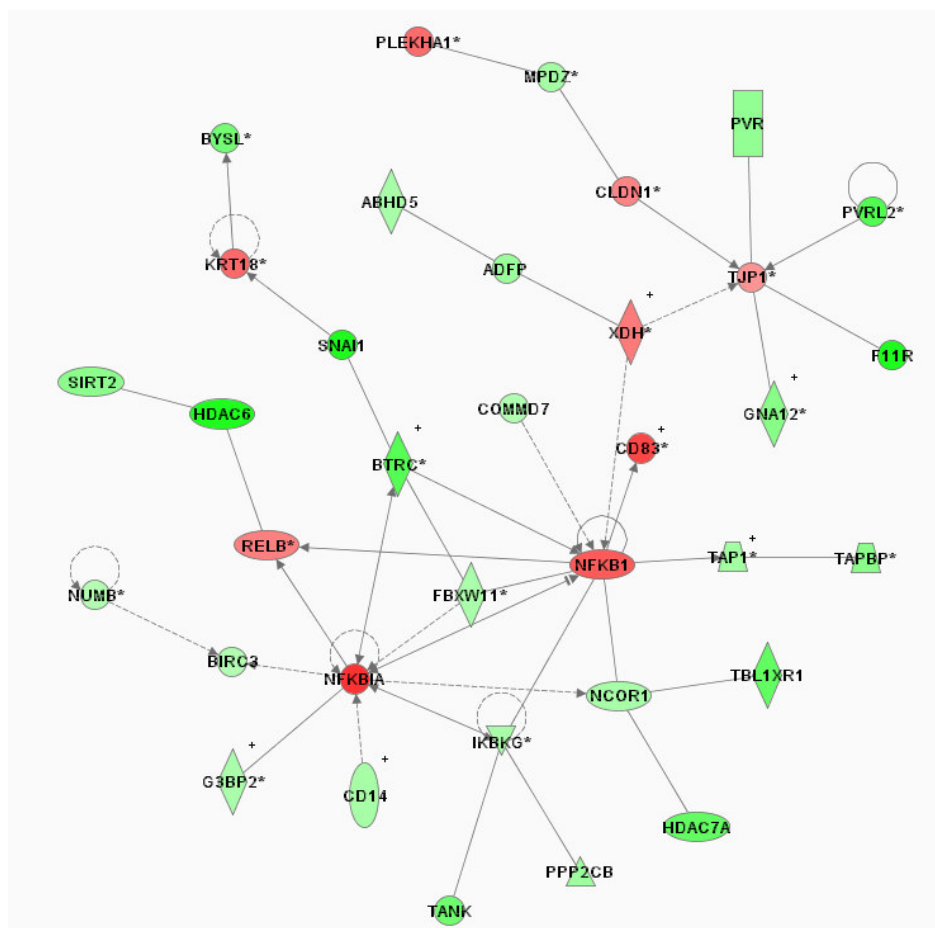


Figura 4.30. Rede gênica 9, modulada em 24 horas (expressão gênica , injúria e anomalias).

Na figura 4.30 está representada a rede gênica 9 de 24 horas. Nessa figura é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *nfkbia*, *nfk1* (que são genes centrais), *cln1*, *cd83* e genes diminuídos como *btrc*, *snail*, *hdac6* (*histone deacetylase 6*) que codifica para uma his-

tona, a qual participa fortemente na regulação da transcrição e progressão do ciclo celular. As histonas modulam a estrutura do DNA afetando o acesso dos fatores transcricionais.

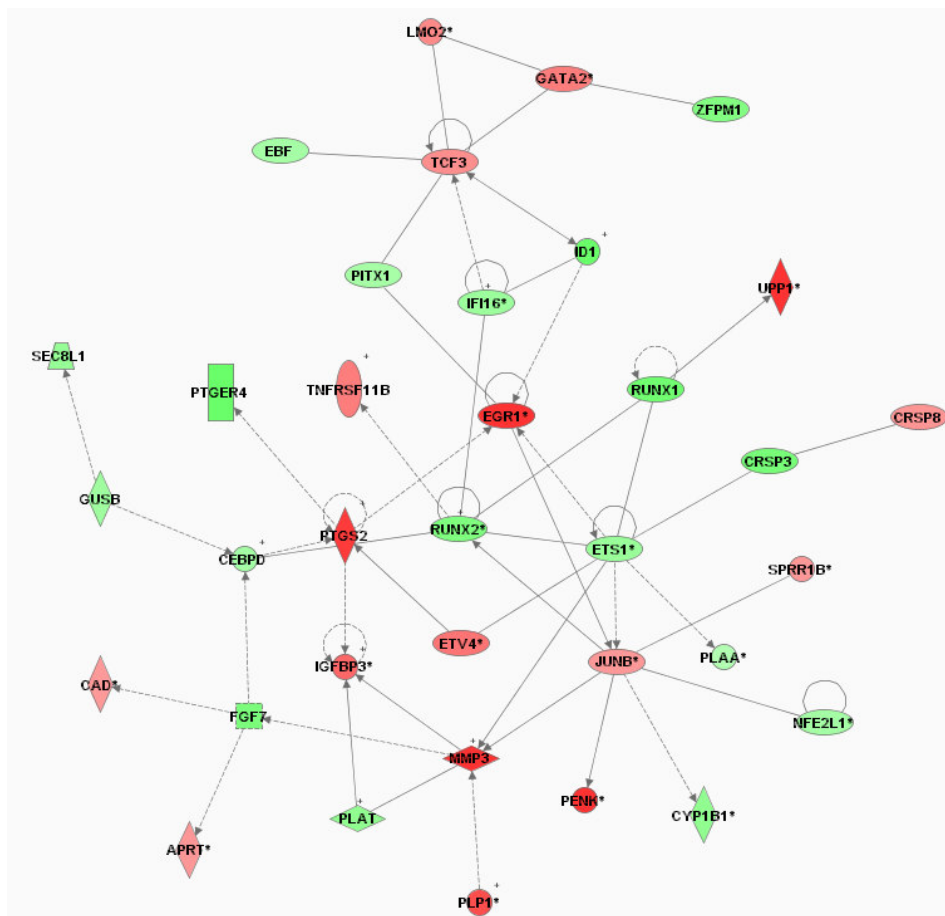


Figura 4.31. Rede gênica 10, modulada em 24 horas (expressão gênica e desenvol. celular).

Na figura 4.31, está representada a décima rede gênica de 24 horas. Nela é possível verificar alguns genes com expressão aumentada como *egr1*, *ptgs2* (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*) que codifica para uma proteína chave na biosíntese de prostaglandina e age como dioxigenase e como uma peroxidase. Está envolvida em vários processos como biosíntese de ácidos graxos, motilidade celular, regulação da pressão sanguínea e regulação da resposta inflamatória. O gene *mmp3* (*matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)*) que codifica para uma proteína do grupo de peptidases envolvidas na degradação da matriz extracelular. Esta proteína é capaz de promover a proliferação celular em vários tipos celulares e também promover funções anti-apoptóticas. A transcrição deste gene é altamente induzida em resposta a muitas citocinas e hormônios. Foram identificados vários genes diminuídos como, *sec8l*, *fgf7* (*fibroblast growth factor*



as quais codificam para proteínas do complexo EIF4F, que está envolvido no reconhecimento do CAP mRNA, recrutando os mRNA para o ribossomo.

#### **4.5.4 Considerações finais sobre a análise de redes gênicas**

Conforme pudemos observar nas figuras anteriores, a análise de redes gênicas propicia uma visualização muito informativa sobre os genes modulados e suas inter-relações. A partir das diversas redes analisadas, é possível extrair alguns temas comuns a elas, como inibição da apoptose, estímulo da divisão celular e indução de resposta imune inflamatória. No entanto, a principal aplicabilidade desse tipo de análise é a navegação e imersão nos dados de microarranjo de forma dinâmica e integrada. Ao se fazer uma “fotografia” dessa integração e dinamicidade, conforme foi realizado nesse trabalho, perde-se muito o poder de análise e a capacidade de entendimento das modulações ocorridas no processo infeccioso. Porém, essa é a única possibilidade que temos para mostrar em um documento estático as relações que estão sendo avaliadas no programa. Além disso, esse tipo de análise representa uma ferramenta de auxílio, mais do que um método definitivo *per se*. Portanto, o programa de visualização e navegação das redes gênicas será utilizado de forma permanente como um auxiliar na caracterização aprofundada que se realizará futuramente com relação às alterações do transcriptoma da célula hospedeira à infecção por *Toxoplasma gondii*.

## 5 Discussão

Neste trabalho foi possível obter vários dados de interação célula-hospedeiro avaliando os processos modulados diante à infecção do parasita intracelular obrigatório *T. gondii*. Atualmente existem apenas dois trabalhos que utilizam a metodologia de microarranjo para avaliar a célula hospedeira frente à interação ao parasita. O trabalho de CHAUSSABEL *et. al.*(2003) que fez uma abordagem comparativa, com ênfase em aspectos imunológicos, de *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Brugia malayi* infectando células dendríticas e macrófagos e o trabalho de BLADER *et. al.* (2001) que avaliaram a expressão de fibroblastos infectados com *T. gondii*.

### 5.1 Comparação com outros estudos de genômica funcional

Utilizaremos o trabalho de BLADER e colaboradores para fins comparativos, pois as células de fibroblastos não são tão especializadas em suas funções como as células dendríticas e macrófagos, sendo o objetivo deste trabalho, avaliar de forma mais ampla o processo infectivo. No trabalho de BLADER e colaboradores, de um total de 11.976 sondas foram selecionados 1503 sondas que tiveram uma diferença maior que duas vezes em relação às células não infectadas e que passaram pelo critério estatístico. Para este estudo foi utilizada cultura de células de fibroblasto de prepúcio humano para a infecção e taquizoítos da cepa PDS (clone de ME49) de *T. gondii*, sendo avaliados os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a infecção.

Apesar das diferenças de metodologias empregadas no trabalho, como a diferença na plataforma de microarranjo, diferença de cultura de células infectadas e diferença no tipo de cepa utilizada para a infecção, obtivemos boas correlações nos resultados.

No trabalho de BLADER *et. al.* durante as primeiras duas horas de infecção foi identificado 63 genes aumentados e 15 genes diminuídos, mais que 2 vezes, sendo que 27 genes dos genes aumentados (47%) estavam associadas a resposta imunológica. Estas moléculas imunorregulatórias incluem as quimiocinas (*gro1*, *gro2*, *lif* e *mcp1*), citocinas (*il-1b*, *il-6*), componentes da matriz e adesão celular (*icam1* e *matrix metalloproteinase 3*), apoptose (*superoxide dismutase 2*) e fatores regulatórios da transcrição (*rel-b*, *nf-κβ*, *p105*, *i-κβa*).

Tabela 5.1. Número de DEG selecionados em nosso trabalho com FC 1,75 e FDR 5%.

	30 minutos	4 horas	24 horas
<b>Aumentados</b>	21	42	290
<b>Diminuídos</b>	21	53	341
<b>Total</b>	42	95	631

Tabela 5.2. Descrição dos 21 genes aumentados em 30 minutos selecionados em nosso trabalho

<b>Nome</b>	<b>símbolo</b>
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	<i>hmgcs1</i>
actin, beta, cytoplasmic	<i>actb</i>
actin, beta, cytoplasmic	<i>actb</i>
activating transcription factor 3	<i>atf3</i>
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	<i>btg2</i>
cytoskeleton associated protein 2	<i>ckap2</i>
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	<i>dnajb1</i>
dual specificity phosphatase 1	<i>dusp1</i>
early growth response 1	<i>egr1</i>
early growth response 2	<i>egr2</i>
FBJ osteosarcoma oncogene	<i>fos</i>
FBJ osteosarcoma oncogene B	<i>fosb</i>
helicase (DNA) B	<i>helb</i>
immediate early response 2	<i>ier2</i>
interferon regulatory factor 1	<i>irf1</i>
matrix metalloproteinase 11	<i>mmp11</i>
Ras and Rab interactor 2	<i>rin2</i>
retinoic acid receptor, gamma	<i>rarg</i>
similar to Ras and Rab interactor 2 (Ras interaction/interference protein 2)	<i>loc547368</i>
transducer of ErbB-2.1	<i>tob1</i>
transformed mouse 3T3 cell double minute 2	<i>mdm2</i>
zinc finger protein 36	<i>zfp36</i>

Em nossos resultados, durante os primeiros 30 minutos de infecção foram identificados 40 genes, sendo 21 genes apresentando um aumento na expressão e 21 genes apresentando uma diminuição na expressão. Destes 21 genes com expressão aumentada, 7 genes são fatores transcricionais - *btg2*, *rarg*, *egr2*, *fosb*, *atf3*, *fos* e *egr1*. Dentre estes 7 genes, apenas *rarg* não foi selecionado pelos critérios mais estridentes de correlação entre os métodos Li-Wong e GCRMA, demonstrando a consistência e força desses aumentos. O gene da beta actina, avaliado por dois *ProbeSets* distintos, foi identificado como tendo sua expressão aumentada em 30 minutos de infecção. Três genes (*mmp11*, *zfp36* e *mdm2*) estão envolvidos no processo de catabolismo de macromoléculas, sendo *zfp36* selecionado pelo critério estrigente de correlação adotado para seleção de genes candidatos. Dando suporte estatístico a esses achados, através da análise de GO, foram evidenciados os processos biológicos de regulação e metabolismo de ácidos nucléicos, transcrição e catabolismo de macromoléculas, as quais estes genes estão intrinsecamente relacionados.

O gene *fosb* apresenta uma importância grande no início do processo infeccioso. Ele foi selecionado pelos critérios estridentes de seleção de genes candidatos, apresentando forte mudança de expressão e é um fator transcricional envolvido em diversos processos importantes, conforme a anotação pelo GO. Além disso, as três redes selecionadas em 30 minutos contém esse gene, representando então a sua influência nas modulações nas etapas iniciais da infecção.

Este gene apresentou um aumento de sua expressão nos dados de trinta minutos de interação de aproximadamente trinta vezes em relação ao controle não infectado. As proteínas da família FOS tendem a formar heterodímeros ou homodímeros e, dessa maneira, apresentam afinidade de ligação ao DNA, provocando a ativação de seus genes alvos. Após a formação do dímero, através de um zíper de leucina, o complexo (fator de transcrição funcional ou proteína-ativadora 1 - AP-1), se ligará a uma seqüência gênica específica, o sítio AP-1, reconhecido como essencial para a transcrição basal ou ativada de vários genes. Simultaneamente, ao interagir com outros fatores de transcrição, o heterodímero das proteínas FOS e JUN formam uma ligação entre sistemas de segundos mensageiros independentes. Essas proteínas e outros ITFs atuam, portanto, como “terceiros mensageiros” nucleares, ligando eventos mediados pelos segundos mensageiros a alterações subseqüentes na expressão gênica. Em concordância com nossos da-



dos, um trabalho envolvendo leucócitos bovinos infectados com *Theileria annulata* foi verificado um aumento significativo na expressão de RNAm dos genes do complexo transcricional AP-1 incluindo FOS e também de proteínas metaloproteinases em células infectadas (BAYLIS *et. al.*, 1995).

Os genes *atf3*, *ier2*, *egr1* e *egr2* estão aumentados a partir de 30 minutos até 24 horas após a infecção. Os genes *egr1* e *egr2* são fatores de transcrição que são ativados em muitos tipos celulares em resposta ao estresse. Trabalhos mostram um aumento da expressão destes genes em células hospedeiras infectadas com alguns tipos de bactérias, como *E. coli* e *Citrobacter rodentium* (DE GRADO *et. al.*, 2001). BLADER *et. al.* mostraram em seu *cluster* os genes *egr1* e *egr2* aumentados durante todo o processo de infecção estudado. Os genes *atf3* e *ier2* que foram selecionados para os critérios utilizados para a seleção de genes candidatos também estão relacionados às redes gênicas 1 e 2, respectivamente, sendo redes que são compostas por *fos* e *fosb*. Também se verifica a presença de *ier3*, gene incluso na rede 1 e 2 e que se mostra aumentado. Corroborando esses dados, BLADER *et. al.* mostraram esses genes também aumentados.

Os genes *irf1*, *btg2* e *zfp36* selecionados pelo critério de genes candidatos foram identificados nas três principais redes gênicas selecionadas, encontrando *irf1* e *btg2* na rede 1 e *zfp36* na rede 2. O gene *irf1* serve como ativador da transcrição dos interferons alfa e beta e também tem se mostrado importante na regulação da apoptose e supressão de tumor. Os membros da família IRF estão envolvidas na regulação do sistema de IFNs e transformação celular. Muitos destes genes são fatores transcricionais que podem seletivamente modular grupos de genes dependendo do tipo celular ou a natureza do estímulo celular, assim como estimular os mecanismos de defesas do hospedeiro contra infecções na produção de óxido nítrico e oncogêneses (HARADA *et. al.*, 1998). Apesar de este gene apresentar um aumento significativo em células infectadas por patógenos intracelulares obrigatórios, aumentando a produção de óxido nítrico (NO) pela célula, estudos indicam que o NO não é importante para a defesa contra patógenos oportunistas como *T. gondii* (KHAN *et. al.*, 1996). BLADER *et. al.* também em seus dados mostraram o gene *irf1* aumentado em 1, 2 e 24 horas após a infecção. A análise da via canônica de sinalização por interferon mostra uma diminuição estabilizada durante todo o processo estudado. Foi também verificado que os genes que se apresentam aumentados são em sua maioria inibitórios do processo de sinalização por interferon como *soc1*, *tc-ptp* e *pias1*.

O gene BTG2 é um dos cinco membros da família de genes antiproliferativos. A proteína BTG2 interage fisicamente com a proteína CAF1, um elemento do complexo geral de transcrição e com PRMY1, uma proteína arginina N-metil transferase demonstrando sua participação como modulador da cascata de transdução de sinal intracelular (DURIEZ *et. al.*, 2004). Visto também em outros trabalhos que as proteínas BTG/TOB acumulam-se na fase G1 e inibem a progressão para a fase S do ciclo celular, sendo assim, a rápida degradação destas proteínas é induzida em resposta a fatores de crescimento e faz-se necessária para libertar as células da fase G1 e possibilitar a progressão do ciclo celular (SASAJIMA *et. al.*, 2002). Sendo assim, é interessante mencionar um trabalho que relaciona o ciclo celular e o envolvimento da interação de *T. gondii*, verificando um aumento significativo da interação de parasitas com as células na fase G1 e fase S em relação às células na fase G2 e M. (GRIMWOOD *et. al.*, 1996).

O gene *zfp36*, foi visto em nossos dados com aumento maior que 8 vezes em relação ao infectado, está envolvido no mecanismo de estabilidade de mRNA, onde a expressão aumentada ou diminuída da tristetraprolina conseqüentemente aumentava ou diminuía a expressão de iNOS devido a modulação na estabilidade do RNAm-iNOS. (FECHIR *et. al.*, 2005). Experimentos mostraram a interação da tristetraprolina com um proteína reguladora de *splicing* (KSRP), que é conhecida por recrutar mRNAs que apresentavam elementos ricos em AU para a degradação. A tristetraprolina não se liga diretamente a esses mRNAs, mas sim com a proteína KSRP do complexo exossomo estabilizando os iNOS-mRNAs (FECHIR *et. al.*, 2005). Outros trabalhos indicam um acúmulo desta proteína em células infectadas com vírus (ESCLATINE *et. al.*, 2004).

O gene *dnajb1*, tem função de chaperona molecular juntamente com DNAK (HSPA1A) e GRPE, sendo envolvidos na conjugação e desmontagem de complexos, remodelagem, renaturação de proteínas desnaturadas, prevenção de agregados e exporte de proteínas. Esta proteína está relacionada à rede gênica 3 em 30 minutos com aumento de aproximadamente 7 vezes em relação ao controle não infectado.

Na seleção de genes, selecionados pelo critério de FC maior que 2x, verificamos alguns genes associados à resposta imunológica, que estão presentes nas redes gênicas selecionadas em 30 minutos como *il6*, *tnfaip3*, *nfkbi3*, *jun*, *junb*, *nfkbia* e *cxcl1*. Os genes *il6* e *nfkbia* são os dois componentes mais conectados e centrais identificados na rede 1 em 30 minutos. O gene *il6* é um componente envolvido em processos inflamatórios e em vários processos celulares como apop-

tose, proliferação, progressão do ciclo celular e outros. Esta interleucina também é expressa de forma aumentada em células musculares induzidas com TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (CHEVREL *et. al.*, 2005). Comparando os dados de BLADER *et. al.* verificamos uma correlação com estes achados. Os genes *il6*, *tnfaip3*, *jun*, *junb* e *nfk $\beta$*  também se apresentaram aumentados em fibroblastos infectados, demonstrando uma relação potencial na expressão destes genes envolvidos na infecção por *T. gondii*.

O gene *ereg* (epiregulina) e *spp1* (osteopontina) também estão presentes nas redes gênicas de 30 minutos. Em nossos dados, a epiregulina tem sua expressão aumentada durante todo o processo infectivo estudado, mas *spp1* está diminuída em 30 minutos e 4 horas de infecção em nossos dados, aumentando sua expressão em 24 horas. Nos dados de BLADER *et. al.*, tanto a epirugulina quanto a osteopontina estão aumentadas em 1 hora de infecção, mas apenas a epi-regulina mantém sua expressão aumentada em todo o processo, como nos nossos dados. Pouco se conhece a respeito desta proteína, ela é membro da família dos EGF podendo funcionar como ligante ao receptor EGFR, bem como ligante aos membros ERBB, receptores da família tirosina quinase. Esta proteína está envolvida na proliferação celular e é encontrada em grande quantidade em tecidos tumorais.

O gene *dusp1* foi selecionado pelos critérios estatísticos e de FC como significativamente aumentado em 30 minutos, *dusp2* aumentado em 4 horas e *dusp9* selecionado e aumentado em 24 horas. A expressão destes genes é induzida por fatores de crescimento e estresse oxidativo. DUSP1, DUSP2 e DUSP9 têm atividade intrínseca de fosfatase, especialmente inativando MAP quinases pela concomitante desfosforilação de ambos resíduos de fosfotirosina e fosfotreonina (CHRISTIE *et. al.*, 2005), tendo sido visto em outros trabalhos uma atuação de inibição do processo de apoptose (WU & BENNETT, 2005). A análise por GO identificou em 4 horas, como sendo uns dos processos biológicos mais relevantes o de desfosforilação de aminoácidos composto pelos genes *dusp1*, *ptpn22*, *ppp2r4*, *dusp9*, *ptprz1*, *dusp2* e *ptpn20*. BLADER *et. al.* também identificaram genes que atuam como fosfatases como *dusp5* e *dusp6* aumentados a partir de 1 hora de infecção em fibroblastos infectados.

O gene *trappc5p* foi selecionado através de critérios de seleção de genes candidatos e este gene aparece diminuído em 30 minutos. Esta proteína é localizada exclusivamente na membrana do Golgi, sendo um componente do complexo chamado TRAPP, agindo na interface RE-Golgi

junto com as SNAREs. A localização de TRAPP no Golgi pode ser importante no ancoramento vesicular nesta membrana. A ausência de um desses componentes pode impedir o transporte vesicular indicando que a associação de TRAPP com a membrana do Golgi é necessária para o ancoramento da vesícula (BARROWMAN *et. al.*,2000). Outro gene diminuído selecionado pelos critérios de genes candidatos foi SNAPAP, um componente do complexo SNARE de proteínas que são importantes no acoplamento e na fusão de vesículas. O tráfego vesicular em células eucarióticas é essencial para processos celulares diversos, incluindo a manutenção de compartimentos celulares distintos, secreção de proteínas e hormônios, fertilização do óvulo e liberação de neurotransmissores. O ciclo de vida de uma vesícula geralmente consiste de 3 estágios: endocitose ou formação da vesícula a partir de membranas celulares específicas; exocitose ou fusão da vesícula com sua membrana alvo; e reciclagem dos componentes da maquinaria protéica após a exocitose.

A exocitose vesicular é controlada por uma maquinaria protéica que é conservada em organismos, desde leveduras a humanos. Proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor* [NSF]- *attachment protein receptor*) são componentes essenciais desta maquinaria. Em exocitose de vesículas sinápticas, três proteínas SNARE estão envolvidas: As proteínas associadas à membrana plasmática syntaxina e SNAP-25 (proteína de 25 KDa associada a sinaptossoma) e a proteína vesicular sinaptobrevina também referida como VAMP (*vesicle-associated membrane protein*) (Gerst, 1999). Outras proteínas conservadas incluem o NSF ATPase e sua adaptadora SNAP, a classe Rab de pequenas proteínas G e seus efetores, a família sinaptotagmina e a família nSec1 (homólogo neuronal da proteína SEC1 de levedura, também referida como MUNC 18). Muitos outros fatores que interagem com SNAREs, como as complexinas, VAP33 (proteína de membrana associada a vesícula/ proteína ligadora de sinaptobrevina) e sinaptofisina foram caracterizados (GERST, 1999).

As proteínas RABs constituem um papel importante na especificidade do transporte vesicular. Elas são GTPases monoméricas, das quais são conhecidas mais de 30 espécies, representando então a maior subfamília de GTPases. Assim como as SNAREs, cada proteína Rab possui uma distribuição característica nas membranas celulares e toda organela possui pelo menos um tipo de RAB na sua superfície citosólica. As proteínas RABs são conhecidas por facilitar e regular o ancoramento (*docking*) nas vesículas e a combinação entre v-SNARE e t-

SNARE, necessária para a fusão entre membranas. Verificando nossos dados a respeito destas proteínas, identificamos 9 genes relacionados a família RAB associadas ao transporte e fusão vesicular e que estão selecionados corentes entre os métodos Li-Wong e gcRMA. Elas se encontram diminuídas em 4 horas e ou 24 horas após a infecção (Tabela 5.2). Os genes *rab1a*, *rab7*, *rab9a* e *rab10* estão na seleção dos genes atribuídos por valor FC maior que 2, totalizando 13 genes da família RAB que estão diminuídos. Os genes *rab1a*, *rab7*, *rab9a* e *rab10* foram identificados nas redes gênicas de 24 horas, mas não foram selecionadas neste trabalho por obter um valor de *score* mais baixo da linha de corte. O gene *Rab interactor 2 (rin2)* aparece na rede gênica 1 em 30 minutos e na rede 8 em 4 horas de infecção. Este gene além de participar de eventos exocíticos, está envolvido em sítios de interação célula – célula (KIMURA *et. al.*, 2006).

Corroborando nossos dados, um trabalho de BATISTA *et al.* (2005), se utilizando de culturas de cardiomiócitos infectadas com *T. cruzi* para uma análise de algumas proteínas Rab GT-Pases, verificou uma diminuição das proteínas RAB7 e RAB11 em células infectadas. Atribuindo essa relação de alteração fisiologia da célula hospedeira na interferência dos eventos relacionados às via endocíticas impedindo assim a fusão de vesículas ácidas no vacúolo parasitóforo (COPPENS & JOINER, 2001).

Outros genes que foram identificados e que também participam do processo de transporte mediado por vesícula RE –Golgi apresentaram expressão diminuída como *sec23a*, *sec811*, *sec7* e *sec63*, sendo *sec811* inserida na rede 10 de 24 horas e *sec23a* inserida na rede 11 de 24 horas, as outras inseridas em redes não selecionadas no trabalho. Os genes *atp6v1d* e *atp6v1b2* são ATPase H(+) de vacúolos e acidificam endossomos, lisossomos, Golgi e vesículas secretórias e transportam prótons através da membrana dentro do espaço extracelular. As bombas vacuolar-ATPase são formadas através de várias subunidades e se utilizam da hidrólise do ATP para mover prótons através da membrana. Essas bombas são envolvidas em várias funções celulares, incluindo regulação do pH citosólico, transporte vesicular, endocitose, secreção e apoptose (KENNELL *et. al.*, 2001). Estes genes foram selecionados como sendo genes candidatos e com expressão diminuída em 24 horas.

Os genes que diminuiram sua expressão e que participam do processo biológico mais evidenciado durante o tempo decorrido de trinta minutos de infecção foram os genes *bpy2ip1*, *arhgap8* e *krt1-19*, envolvidos na biogênese e na organização do citoesqueleto. *BPY2 interacting*

*protein 1* (BPY2IP1) é uma proteína importante na organização e na biogênese dos microtúbulos. *Rho GTPase activating protein 8* (ARHGAP8) tem sua atividade atribuída como ativadora de GT-Pases, além de ser importante na organização do citoesqueleto de actina, também regula de forma positiva a migração da célula. *Keratin complex 1, acidic, gene 19* (*krt1-19*) ou citoqueratina 19 é um constituinte estrutural do citoesqueleto a qual está presente no sarcolema (disco Z) e filamentos intermediários. Trabalhos envolvendo *T. cruzi* descreveram uma glicoproteína multiadesiva chamada Tc85-11, que contém dois sítios de ligação, um sendo para a laminina e outro para a citoqueratina 18. Anticorpos contra citoqueratina 18 inibiram significativamente a invasão de *T. cruzi*, mostrando a importância da citoqueratinas do hospedeiro no processo de invasão de parasitas intracelulares (MAGDESIAN *et. al.*, 2001).

Tabela 5.3. Representação parcial da listagem de DEG, evidenciando as proteínas RAB selecionadas

Genes selecionados	Perfil de expressão
<i>rab1, member ras oncogene family</i>	diminuído em 24hs
<i>rab14, member ras oncogene family</i>	diminuído em 24hs
<i>rab24; member ras oncogene family</i>	diminuído em 24hs
<i>rab34; member of ras oncogene family</i>	diminuído em 4 e 24hs
<i>rab3d; member ras oncogene family</i>	diminuído em 24hs
<i>rab4a, member ras oncogene family</i>	diminuído em 4 e 24hs
<i>rab4b, member ras oncogene family</i>	diminuído em 4 e 24hs
<i>ras and rab interactor 2</i>	diminuído em 30min, 4 e 24hs

No trabalho de BLADER, em 24 horas após a infecção foram selecionados 567 genes, dos quais 376 correspondem a genes já caracterizados e 191 a genes com funções não conhecida. A caracterização funcional indicou numerosos processos celulares que são modulados durante a infecção. Estes processos incluem genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos (13,7%); regulação transcricional (13,2%); síntese protéica e degradação (12,3%); sinalização celular (11,4%); inflamação (8,2%); adesão celular e citoesqueleto (8,2%); metabolismo de aminoácido e nucleotídeos (4,7%); ciclo celular (4,1%) e apoptose (3%).

Em nossos dados obtivemos 42 genes selecionados em 30 minutos, 95 genes selecionados em 4 horas e 631 genes selecionados em 24 horas que passaram pelo critério estatístico e *Fold-Change*>1,75. Deste 631 genes, 435 genes tinham processos celulares anotados, sendo que 120 genes (27,6%) estão envolvidos no metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, 78 genes (17,9%) estão envolvidos na regulação transcricional, 77 genes (17,7%) estão envolvidos na sinalização celular, 44 genes (10,1%) estão envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos, 29 genes (6,7%) estão envolvidos no ciclo celular, 28 genes (6,4%) estão envolvidos na adesão celular e citoesqueleto, 24 genes (5,5%) estão envolvidos na síntese protéica e degradação, 22 genes (5,1%) estão envolvidos na apoptose e 8 genes (1,8%) estão envolvidos em processos inflamatórios, conforme pode ser visto na tabela 5.4.

Tabela 5.4. Processos biológicos modulados em 24 horas de infecção em nosso estudo

<b>Processo Biológicos</b>	<b>nº de genes</b>	<b>%</b>
Metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos	120	27,6
Regulação transcricional	78	17,9
Sinalização celular	77	17,7
Metabolismo de lipídeos e carboidratos	44	10,1
Ciclo celular	29	6,7
Adesão Celular e Citoesqueleto	28	6,4
Síntese protéica e degradação	24	5,5
Apoptose	22	5,1
Inflamação	8	1,8

## **5.2 Sistemas e processos biológicos modulados**

Passaremos agora a uma revisão de alguns processos que foram encontrados diferencionalmente expressos em nossos dados.

### **5.2.1 Cálcio**

O cálcio é distribuído intracelularmente e é conhecido como o segundo mensageiro com função crítica no processo de invasão das células de mamíferos por numerosos patógenos, os

quais modificam a sinalização de cálcio dentro da célula hospedeira durante a invasão. Esse tipo de mudança já foi evidenciado na invasão por *T. gondii*, sendo considerada um evento importante para a infecção (LOVETT & SIBLEY, 2003). A concentração intracelular de cálcio livre na célula hospedeira também varia nas células infectadas (BOUCHOT *et. al.*, 1999). Em outros trabalhos, foi observado um gradiente positivo de concentração de cálcio do citoplasma da célula hospedeira para o PV em 24 horas após a infecção.

Quando o parasita entra na célula ele é capaz de ativar as bombas de cálcio do hospedeiro. Através dos poros na membrana do vacúolo parasitóforo o cálcio pode, por difusão, passar através da membrana devido a presença de produtos secretados pelo parasita dentro do vacúolo, os quais são capazes de se ligar ao cálcio (CESBRON-DELAUW *et. al.*, 1989). Um candidato para essa atividade é a proteína GRA1 que é vista associada com a rede túbulo-vesicular do PV, a qual tem alta afinidade por cálcio. Como consequência da infecção, após 48 horas quando os parasitas estão replicando e formando rosetas, a concentração de cálcio no citoplasma da célula hospedeira é baixo em relação as células não infectadas. O aumento da concentração de cálcio no hospedeiro e o disparo do parasita parecem ser um sinal coordenado. O aumento da concentração de cálcio no PV pode ser sinal para desencadear o egresso do parasita. Exposição do parasita ao ditiotreitol pode induzir esse egresso pela ativação das NTPases do parasita, sugerindo o envolvimento dessa enzima no influxo de cálcio (SILVERMAN *et. al.*, 1998; STOMMEL *et. al.*, 1997).

A CALB3 é uma proteína citosólica da mesma família das proteínas cálcio ligantes como a calmodulina, parvalbumina, troponina C e proteína S100, sendo encontrada em vários tecidos como intestino, placenta, útero, neurônios, retina e rins de mamíferos. A função principal desta proteína não bem conhecida. Esta proteína pode aumentar a absorção de  $Ca^{2+}$  no citoplasma aumentando o transporte ativo de  $Ca^{2+}$  na membrana das células. A proteína CALB3 se liga aos canais de cálcio  $CaV2.1$  impedindo a passagem de cálcio podendo de forma independente, regular a plasticidade sináptica inibindo o influxo de  $Ca^{2+}$  dentro do neurônio. (FEW *et. al.*, 2005; LEE *et. al.*, 2002).

A análise por GO indicou 28 genes envolvidos na função molecular de ligação a cálcio. O gene *calb3* foi selecionado pelos critérios de genes candidatos e foi verificada uma expressão de aproximadamente 3 vezes em relação ao controle no tempo de 30 minutos e 4 horas de infecção.



Esta proteína está também relacionada com a inflamação e processos alérgicos. A função envolvendo resposta parasita – hospedeiro é modulada não somente por cálcio, mas também por íons metálicos como o zinco (MOROZ *et. al.*, 2003).

A osteopontina (OPN) liga-se ao cálcio e interage com o receptor de vitronectina,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrina. Liga-se também covalentemente à fibronectina via transglutaminase-catalisada. Nos ossos é produzida pelos osteoblastos e osteoclastos. OPN plasmática tem demonstrado indicação positiva para câncer de cólon e pulmão assim como em metástase. A presença notável de OPN em vários tumores está fortemente relacionada ao estágio patológico, sugerindo papel importante na agressividade, progressão e metástase do tumor. Em nossos dados este gene teve sua expressão diminuída em 30 minutos de infecção e está relacionado na rede 1.

O gene *s100a8* (*s100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)*) codifica para uma proteína da família das S100 que contém domínios ligantes para o íon cálcio. Esta proteína está envolvida em vários processos celulares como progressão do ciclo celular e diferenciação. Esta proteína participa do processo inflamatório e também age como inibidora das caseínas quinases. Esta proteína mostrou ser importante nos eventos infecciosos da malária (JARAMILLO *et. al.*, 2004). Em nossos dados a expressão deste gene teve sua expressão aumentada em 4 horas.

### 5.2.2 *Vesículas lisossomais*

O gene *snapap* apresentou uma diminuição na expressão de aproximadamente 3 vezes em relação ao controle em 24 horas, verificando uma diminuição gradual de acordo com o tempo.

SNAPAP é um componente do complexo SNARE de proteínas que são importantes no acoplamento e na fusão de vesículas sinápticas. As proteínas Snap e Rabs são conhecidas por facilitar e regular o ancoramento (*docking*) nas vesículas e a combinação entre v-SNARE e t-SNARE, necessária para a fusão entre membranas.

O gene *atp6v1b2* e *atp6v1d* apresentam uma diminuição na expressão de aproximadamente 2 vezes em relação ao controle em 24 horas.

Estes genes contêm um componente ATPase vacuolar, uma multisubunidade da enzima que medeia a acidificação de organelas intracelulares eucarióticas. As Vacuolar H(+)-ATPases acidificam endossomos, lisossomos, Golgi e vesículas secretórias e transporta prótons através da

membrana dentro do espaço extracelular. As bombas vacuolares ATPase são formadas através de várias subunidades e utilizam a hidrólise do ATP para mover prótons através da membrana. Essas bombas são envolvidas em várias funções celulares, incluindo regulação do pH citosólico, transporte vesicular, endocitose, secreção e apoptose (KENNELL *et. al.*, 2001).

### 5.2.3 Apoptose

A carga de parasitas é o maior contribuinte da patogenezidade da toxoplasmose em camundongos (MORDUE *et. al.*, 2001; GAVRILESCU & DENKERS, 2001), relacionado com a reestimulação do sistema imune levando a níveis altos de citocinas das célula Th1, com isso, aumentando a apoptose celular. Efeitos da infecção por *T. gondii* no fator nuclear –  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) e MAP quinases tem sido recentemente revisadas. O NF-  $\kappa$ B tem um papel central na regulação resposta imune anti-apoptótica e inflamatória. Diferenças na habilidade de translocar NF-  $\kappa$ B do núcleo tem sido associadas com o tipo de cepa do tipo II ME49 em esplenócitos e macrófagos de camundongo (ROBBEN *et. al.*, 2004).

O gene *irf1* apresentou um aumento na expressão de aproximadamente 4 vezes em relação ao controle em 30 minutos.

O *irf1* codifica uma proteína membro da família de fatores regulatórios de transcrição de interferons. O *irf1* serve como ativador da transcrição dos interferons alfa e beta. IRF1 tem se mostrado importante na regulação da apoptose e supressão de tumor. O IRF1 é uma fator transcricional com propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas mediando o processo apoptótico induzido por PPAR- $\gamma$  em células musculares lisas vasculares (VSMCs) (LIN *et. al.*, 2004).

O gene *atf3* apresentou um aumento na expressão de aproximadamente 4 vezes em relação ao controle em 4 horas e 8 vezes em 24 horas após a infecção.

ATF3 protege as células da apoptose induzida por TNF- $\alpha$ . Em células que tem expressão aumentada de *atf3*, o gene *p53* tem sua transcrição diminuída, o que foi verificado em nossos dados. ATF3 pode funcionar como um fator de sobrevivência da célula durante a inflamação (KAWAUCHI *et. al.*, 2002).

O gene *egr1* apresentou um aumento na expressão de aproximadamente 4 vezes em relação ao controle em 30 minutos, 3 vezes em relação ao controle em 4 horas e 4 vezes em relação ao controle 24 horas. *egr2* apresentou um aumento na expressão de aproximadamente 10 vezes

em relação ao controle em 30 minutos, 10 vezes em relação ao controle em 4 horas e 64 vezes em relação ao controle 24 horas.

EGR1 e EGR2 estimulam a expressão de genes relacionados à transformação maligna, progressão do ciclo celular e inibição da apoptose (VIROLLE *et al.*, 2003).

Na análise por GO dos 24 genes encontrados para apoptose 14 são reguladores.

O gene *nfkbia* (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), que codifica para um inibidor do complexo NFkB, inativando NF-kappa-B no citoplasma. Trabalhos mostram que mutantes para alelos deste genes aumentam a apoptose celular em camundongos (WAN & DE GREGORI, 2003). Em nossos dados este gene apresentou expressão aumentada em 30 minutos.

*socs1* (*suppressor of cytokine signaling 1*), que codifica para uma proteína inibitória de STAT, também conhecida como supressor de sinalização de citocina. A expressão deste gene é induzida por várias citocinas, incluindo IL2, IL3, CSF2/GM-CSF e interferon (IFN)-gama. Esta proteína também inibe apoptose. Em nossos dados ela apresenta um aumento na sua expressão em 4 horas de infecção.

O gene *fgl2* (*fibrinogen-like 2*) codifica para uma proteína similar a cadeia beta e gama do fibrinogênio. O FGL2 forma um complexo tetramérico que é estabilizado por ligações dissulfeto. FGL2 tem função fisiológica principalmente nas mucosas. Estudos revelam que a apoptose em neutrófilos diminui a expressão deste gene (KOBAYASHI *et. al.*, 2003). Em nosso dados este gene tem sua expressão aumentada em 4 horas.

O gene *dusp1* (*dual specificity phosphatase 1*) que codifica uma proteína importante na regulação negativa da proliferação e na resposta celular ao estresse. Este gene inibe o processo de apoptose em fibroblastos (WU & BENNETT, 2005). Em nossos dados este gene apresentou um aumento em sua expressão em 4 horas de infecção.

O gene *map3k1* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*) que codifica uma serina/treonina quinase que ocupa uma função importante na rede de fosforilação de enzimas que integram a resposta celular e estímulos metabólicos, incluindo a insulina e fatores de crescimento. Esta proteína protege a célula da apoptose (YUJIRI *et. al.*, 1998). Em nossos dados esse gene aumentou sua expressão em 4 horas.

O gene *bmp2* (*bone morphogenetic protein 2*) codifica uma citocina da superfamília das TGFB. Ela induz a formação de cartilagem e diferenciação das células cardíacas. Foi verificado um aumento na apoptose, associado a esta proteína, porém em células musculares esta proteína estimula a expressão de moléculas anti-apoptóticas. Em nossos dados esse gene tem sua expressão aumentada em 24 horas de infecção.

O gene *tp53* contém domínios de ligação-DNA podendo, desta forma, ativar a expressão de genes *downstream* inibindo o crescimento, tendo assim, sua função de supressor de tumor. Muitos trabalhos demonstram seu papel na regulação da apoptose celular. Trabalhos envolvendo camundongos mutantes para este gene demonstram uma inibição significativa no processo de apoptose celular (AMSON, *et. al.*, 2000). Em nossos dados esse gene tem sua expressão diminuída em 24 horas, sendo este gene identificado como elemento central na rede 3 em 24 horas.

Os genes *tnfrsf1a* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*) e *tnfrsf1b* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B*) codificam para membros da família de receptores TNF. Estas proteínas juntamente com o TNF-receptor 1 formam um heterocomplexo que age recrutando duas proteínas anti-apoptóticas, c-IAP1 e c-IAP2, que processam a atividade da ubiquitina E3 ligase. A função das IAPs na sinalização do receptor de TNF não é bem conhecida, entretanto, c-IAP1 é um potencial indutor da apoptose pela ubiquitinação e degradação do fator 2 associado ao receptor de TNF que desencadeia sinais anti-apoptóticos. Em nossos dados estes genes apresentaram sua expressão diminuída em 24 horas.

O gene *pten* (*phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)*) codifica para uma proteína identificada como supressor tumoral. Uma regulação negativa desta proteína na célula regula negativamente a via de sinalização AKT/PKB. Esta proteína está envolvida em vários processos celulares como indução da apoptose, migração celular, desfosforilação de aminoácidos, regulação negativa do ciclo celular e desenvolvimento do sistema nervoso central (CHUENKOVA *et. al.*, 2001). Em nossos dados este gene apresenta sua expressão diminuída em 24 horas.

#### **5.2.4 Ciclo Celular**

Em uma avaliação dos genes envolvidos no ciclo celular, foram encontrados 29 genes , sendo 11 destes envolvidos na mitose.

Os principais genes selecionados como aumentados e envolvidos no ciclo celular são: *fos* e *fosb*, que induzem diretamente a transcrição da ciclina D1 podendo ter essas proteínas, um papel crítico na progressão do ciclo celular juntamente com a estimulação por soro (BROWN *et. al.*, 1998); o gene *btg2* codifica uma proteína membro da família BTG/Tob. Esta família apresenta estruturalmente proteínas relacionadas a processos antiproliferativos, estando envolvida na regulação da transição da fase G1/S no ciclo celular (SASAJIMA *et. al.*, 2002); EGR1 estimula a expressão de genes relacionados à transformação maligna, progressão do ciclo celular e inibição da apoptose (VIROLLE *et al.*, 2003) e o gene *s100a8* (*S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)*), envolvida em vários processos celulares como progressão do ciclo celular e diferenciação, participando do processo inflamatório e também agindo como inibidora das caseínas quinases, mostrando-se importante nos eventos infecciosos da malária (JARAMILLO *et. al.*, 2004).

Os genes encontrados como diminuídos durante o processo de infecção foram: *myod* (*myogenin (myogenic factor 4)*) e *myod1* (*myogenic differentiation 1*), que codificam proteínas que regulam a diferenciação das células musculares bloqueando o ciclo celular, sendo um pré requisito para iniciação miogênica. Estas proteínas estão envolvidas na regeneração muscular; CDKN2B, CDKN2D e CDKN1A que codificam inibidores das quinases dependentes de ciclina, inibindo a atividade do complexo CDK2 ou CDK4 regulando a progressão do ciclo celular na fase G1; TP53 (*Tumor protein p53*), uma proteína nuclear que desempenha um papel essencial na regulação do ciclo celular, especificamente na transição da fase G0 para G1; HDAC6 (*histone deacetylase 6*) que codifica uma histona, a qual participa fortemente na regulação da transcrição e progressão do ciclo celular e o gene *pten* (*phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)*) codifica uma proteína identificada como supressor tumoral e foi descrito no tópico anterior.

Os ligantes da superfície da célula hospedeira envolvidos no processo de interação com o parasita são pouco caracterizados. Uma dessas moléculas estudada foi a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) na célula hospedeira durante a infecção por *T. gondii*. Anticorpos contra ICAM1 inibiram a transmigração do parasita através da célula implicando esse receptor no processo de invasão celular. A imunoprecipitação de ICAM1 revelou a presença de MIC2, uma proteína de adesão do parasita, indicando que esta interação ocorre com proteínas do parasita (BARRAGAN *et. al.*, 2005). A expressão dos ligantes de superfície da célula hospedeira parece

também ser dependente do ciclo celular, fenômeno visto em várias linhagens celulares testadas *in vitro* (DVORAK & CRANE, 1981; GRIMWOOD *et. al.*, 1996). Em populações de células CHO (*chinese hamster ovary*) e MDBK (*bovine kidney*), os parasitas aderem em uma proporção três vezes maior em células que estão nas fases G1 e S do ciclo celular do que em relação as que entram na fase G2/M (GRIMWOOD *et. al.*, 1996). Em nossos dados *icam1* tem sua expressão aumentada aproximadamente 1,5 vezes a partir de 30 minutos de infecção.

### **5.2.5 Outras funções**

O conjunto de dados obtidos no presente trabalho é amplo. Nos tópicos anteriores, fizemos uma descrição dos genes e funções mais fortemente modulados, que apresentam uma função bem conhecida, permitindo um embasamento da consistência dos dados. Esse trabalho de caracterização das funções mais conhecidas continua em andamento, mas o que foi descrito até o momento demonstra a importância de determinados processos biológicos na infecção por *T. gondii*.

É importante salientar que, em um estudo de genômica funcional, a quantidade de genes avaliados é muito grande, possibilitando ao pesquisador descobrir genes com funções desconhecidas que estejam participando do processo infeccioso. A partir da identificação desses genes, é possível, através do uso de técnicas modernas de biologia, como o RNA de interferência, avaliar a importância desses genes pouco conhecidos no processo infeccioso.

A seleção desses genes candidatos foi feita de forma altamente estridente, conforme descrito anteriormente, e estamos atualmente utilizando as informações sobre redes gênicas para selecionar novos alvos.

## 6 Conclusões

De uma maneira geral foi possível observar várias modulações nas células de linhagens primárias musculares esqueléticas de camundongo diante a infecção por *T. gondii*. As conclusões desse trabalho são as seguintes:

- Os mecanismos utilizados pelo parasita durante o processo infectivo causam muitas mudanças na regulação transcricional da célula hospedeira. Vários genes candidatos foram identificados nas células infectadas potencialmente envolvidos no processo de interação com o parasita.
- Genes relacionados ao processo de transporte e fusão vesicular foram encontrados como DEG, diminuídos em relação às células controle, indicando uma possível alternativa utilizada pelo parasita em evitar a fusão de vesículas acídicas ao vacúolo parasitóforo.
- Genes que compõem uma ATPase vacuolar, uma multisubunidade da enzima que medeia a acidificação de organelas intracelulares eucarióticas, sofreram uma diminuição na expressão no decorrer do processo infectivo, sendo uma forte evidência da modificação da capacidade de formação de vesículas acídicas na célula hospedeira
- Muitos genes anti-apoptóticos sofreram aumento na expressão nos eventos iniciais de infecção e genes responsáveis pelo processo de ativação da morte celular programada sofreram diminuição.
- Apesar das grandes diferenças metodológicas, cultura celular e cepa utilizada, muitos genes selecionados como significativamente importantes no processo de infecção quando comparados ao trabalho de BLADER e colaboradores, obtiveram correspondência.
- Genes envolvidos no processo inflamatório foram encontrados como aumentados principalmente nos eventos iniciais da infecção.
- Muitos genes foram encontrados modulados em todo o processo estudado envolvidos no ciclo celular, sendo sua grande maioria, genes da fase G1/S do ciclo, demonstrando a importância destes genes no processo de infecção.

## 7 Perspectivas

Este trabalho gera diversas perspectivas:

- A quantificação por PCR em tempo real de alguns genes selecionados, bem como a realização de algum ensaio funcional a nível protéico (bioquímico, imunofluorescência), serão realizados, visando corroborar os dados, a fins de publicação do trabalho de genômica funcional;
- Uma descrição mais aprofundada dos genes diferencialmente expressos e suas redes está em andamento, tarefa esta que demanda uma grande quantidade de tempo;
- Avaliação detalhada das principais redes gênicas selecionadas nos eventos iniciais do processo infectivo;
- Caracterização das proteínas com função não conhecida diferencialmente expressas, as quais podem definir muitas peculiaridades no processo infectivo;
- Uma análise mais criteriosa da infecção, avaliando uma quantidade maior de tempos de infecção, os quais permitirão o uso de métodos de análise mais poderosos, visando aumentar ainda mais o conhecimento das vias biológicas moduladas durante o processo de infecção do *T. gondii* com as células hospedeiras, em especial as mudanças menos gerais e, portanto, potencialmente mais interessantes;
- A avaliação da expressão diferencial diante de outros tipos celulares e/ou em diversas linhagens de camundongo, em especial as isogênicas;
- Utilização de cepas distintas de *T. gondii* na avaliação de mudança dos padrões de expressão gênica do hospedeiro para o mesmo tipo celular;
- A análise através de inibidores para os genes candidatos no processo de infecção e sua importância na interação parasita-hospedeiro;
- A utilização de técnicas como RNAi para os genes candidatos no processo de infecção e sua importância na interação parasita-hospedeiro.



## 8 Referências bibliográficas

- Abdulkadir, S. A.; Carbone, J. M.; Naughton, C. K.; Humphrey, P. A.; Catalona, W. J. & Milbrandt, J. (2001) Frequent and Early Loss of the EGR1 Corepressor NAB2 in Human Prostate Carcinoma. *Human Pathology*, v. 32, p.935-939.
- Abdulkadir, S. A.; Qu, Z.; Garabedian, E.; Song, S. K.; Peters, T. J.; Svaren, J.; Carbone, J. M.; Naughton, C. K.; Catalona, W. J.; Ackerman, J. J.; Gordon, J. I.; Humphrey, P. A. & Milbrandt, J. (2001) Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice. *Nature Medicine*, v. 7, p.101-107.
- Abou-Bacar, A.; Pfaff, A. W.; Georges, S.; Letscher-Bru, V.; Filisetti, D.; Villard, O.; Antoni, E.; Klein, J. P. & Candolfi, E. (2004). Role of NK Cells and Gamma Interferon in Transplacental Passage of *Toxoplasma gondii* in a Mouse Model of Primary Infection. *Infect Immun*. 72(3): 1397–1401.
- Achbarou, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Sadak, A.; Fortier, B.; Leriche, M. A.; Camus, D. & Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 103 Pt 3, 321- 29.
- Affymetrix (2002). Statistical algorithms description document. Technical report. [http://www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/sadd whitepaper.pdf](http://www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/sadd%20whitepaper.pdf).
- Aikawa, M.; Komata, Y.; Asai, T. & Midorikawa O. (1977). Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. *Am J Pathol* 87, 285-296.
- Amson, R.; Lassalle, J. M.; Halley, H.; Prieur, S.; Lethrosne, F.; Roperch, J. P.; Israeli, D.; Gendron, M. C.; Duyckaerts, C.; Checler, F.; Dausset, J.; Cohen, D.; Oren, M. & Telerman, A. (2000) Behavioral alterations associated with apoptosis and down-regulation of presenilin 1 in the brains of p53-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5346-50.
- Andrade, E. F.; Stumbo, A. C.; Monteiro-Leal, L. H.; Carvalho, L. & Barbosa. H. S. (2001). Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 33 (3), 337-341.
- Andreucci, J. J.; Grant, D.; Cox, D. M.; Tomc, L. K.; Prywes, R.; Goldhamer, D. J.; Rodrigues, N.; Bédard, P. A. & McDermott, J. C. (2002) Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 10;277(19):16426-32.

- Araujo, F. G.; Williams, D. M.; Grumet, F. C. & Remington, J. (1976). Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 13:1528–1530.
- Araújo-Jorge, T. C.; Barbosa, H. S.; Moreira, A. L.; De Souza, W. & Meirelles, M. N. L. (1986). The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblast and fibers of skeletal muscle. *Z Parasitenkd* 72: 577-584.
- Asai, T.; Miura, S.; Sibley, L. D.; Okabayashi, H. & Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 270, 11391- 11397.
- Asai, T.; O'Sullivan, W. J.; Kobayashi, M.; Gero, A. M.; Yokogawa, M. & Tatibana, M. (1983). Enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 7, 89-100.
- Baneth, G.; Shkap, V. & Savitsky, I. (1996). The prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* 51:31-33.
- Barbosa, H. S.; Pereira, M. C. S. & Meirelles, M. N. L. (2000). Protocolos de culturas primárias. Cap. 18.2 Em: Doença de Chagas: Manual para experimentação animal, Tania Araújo-Jorge & Solange Lisboa de Castro (org), Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, pp 297-313.
- Barragan, A. & Sibley, L. D. (2002). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* 195, 1625–1633.
- Barragan, A.; Brossier, F. & Sibley, L. D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol.* 7(4):561-8.
- Barrowman, J.; Sacher, M. & Ferro-Novick, S. (2000) TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking. *EMBO J.* 19(5):862-9.
- Bassett, J. R.; Eisen, M. B. & Bosuski, M. S. (1999). Gene expression informatics-it's all in your mine. *Nat. Genet.* 21(1 Suppl):51-55.
- Bastien, P. (2002) Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Suppl.1,p.205-215.
- Batista, D. G.; Silva C. F.; Mota, R. A.; Costa L. C. & Meirelles, M. N.; Meuser-Batista, M; Soeiro M. N. (2005) *Trypanosoma cruzi* Modulates the Expression of Rabs and Alters the Endocytosis in Mouse Cardiomyocytes In Vitro. *J Histochem Cytochem.* <http://www.jhc.org/cgi/rapidpdf/jhc.5A6654.2005v1>

- Baylis, H. A.; Megson, A. & Hall, R. (1995) Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Mol Biochem Parasitol.*;69(2):211-22.
- Beckers, C. J.; Dubremetz, J. F.; Mercereau-Puijalon, O. & Joiner, K. A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127, 947-961.
- Bermudes, D.; Peck, K. R.; Afifi, M. A.; Beckers, C. J. & Joiner, K. A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 269, 29252-29260.
- Berthet, C.; Guehenneux, F.; Revol, V.; Samarut, C.; Lukaszewicz, A.; Dehay, C.; Dumontet, C.; Magaud, J. P. & Rouault, J. P. (2002) Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes to Cells*, v. 7, p. 29-39.
- Black, M. W. & Boothroyd J. C. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(3):607-23.
- Blackwell, J. M., Roberts, C. W. & Alexander, J. (1993). Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice. *Parasite Immunol.* 15:317-324.
- Blader, I. J.; Manger, I. D. & Boothroyd, J. C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem.* 276(26):24223-31.
- Bloodgood, R. A. (1989). Gliding motility: can regulated protein movements in the plasma membrane drive whole cell locomotion? *Cell Motil. Cytoskeleton* 14:340-344.
- Bonhomme, A.; Bouchot, A.; Pezzella, N.; Gomez, J.; Le Moal, H. & Pinon, J. M. (1999). Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev* 23, 551-561.
- Boothroyd, J. C.; Hehl, A.; Knoll, L. J. & Manger, I. D. (1998). The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Inter. J. Parasitol.* 28:3-9.
- Boothroyd, J. C. & Grigg, M. E. (2002) Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strain cause different disease? *Urr. Opin. Microbiol.* 5(4)438-342.

- Bottone, F. G. Jr; Moon, Y.; Alston-Mills, B. & Eling, T. E. (2005) Transcriptional regulation of activating transcription factor 3 involves the early growth response-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 315(2):668-77.
- Bouchot, A.; Zierold, K.; Bonhomme, A.; Kilian, L.; Belloni, A.; Balossier, G.; Pinon, J. M. & Bonhomme, P. (1999). Tachyzoite calcium changes during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 85, 809-818.
- Bradley, P. J. & Boothroyd, J. C. (1999). Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROP1 by mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100:103–109.
- Bradley, P. J., & Boothroyd, J. C. (2001). The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int. J. Parasitol.* 31:1177–1186.
- Bradley, P. J.; Hsieh, C. L. & Boothroyd, J. C. (2002). Unprocessed *Toxoplasma* ROP1 is effectively targeted and secreted into the nascent parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125:189–193.
- Bratt, A.; Wilson, W. J.; Troyanovsky, B.; Aase, K.; Kessler, R.; Van Meir, E. G. & Holmgren, L. (2002) Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. *Gene.* 18;298(1):69-77.
- Brown, C. R.; Hunter, C. A.; Estes, R. G.; Beckmann, E.; Forman, J.; David, C.; Remington, J. S. & McLeod, R. (1995). Definitive identification of a gene that confers resistance against toxoplasmosis. *Immunology* 85:419–428.
- Brown, J. R.; Nigh, E.; Lee, R. J.; Ye, H.; Thompson, M. A.; Saudou, F.; Pestell, R. G.; Greenberg, M. E. (1998) Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 18(9):5609-19.
- Brown, P. O. & Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21(1 Suppl):33-37.
- De Camargo MC, Antunes CM, Chiari Cde A. (1995) Epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in the municipality of Ribeirao das Neves, MG. I. Importance of domestic animals as sources of *T. gondii* infection in humans. *Rev Soc Bras Med Trop.* 28(3):211-4.
- Cao, D. & Pizzorno, G. (2004) Uridine phosphorylase: an important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation.. *Drugs Today (Barc).* May;40(5):431-43.

- Cao, X. and Barlowe, C. (2000). Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J. Cell Biol.* 149, 55-66.
- Carey, K. L.; Jongco, A. M.; Kim, K. & Ward, G. E. (2004). The *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein ROP4 Is Secreted into the Parasitophorous Vacuole and Becomes Phosphorylated in Infected Cells. *Eukaryot Cell.* 3(5):1320-30.
- Carruthers, V. B. & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 73, 114-123.
- Carruthers, V. B.; Sherman, G. D. & Sibley, L. D. (2000). The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem* 275, 14346-14353.
- Carvalho L, & De Souza, W. (1989). Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 36: 164-170.
- Causton, H. C.; Ren, B.; Koh, S. S.; Harbison, C. T.; Kanin, E.; Jennings, E. G.; Lee, T. I.; True, H. L.; Lander, E. S. & Young, R. A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12(2):323-37.
- Cesbron-Delauw, M. F.; Guy, B.; Torpier, G.; Pierce, R. J.; Lenzen, G.; Cesbron, J. Y.; Charif, H.; Lepage, P.; Darcy, F.; Lecocq, J. P. *et al.* (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7537-7541.
- Chaussabel, D.; Semnani, R. T.; McDowell, M. A.; Sacks, D.; Sher, A. & Nutman, T. B. (2003). Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood.* 102(2):672-81.
- Chen, G.; Cizeau, J.; Vande-Velde, C.; Park, J. H.; Bozek, G.; Bolton, J.; Shi, L.; Dubik, D. & Greenberg, A. (1999) Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 274(1):7-10.
- Chevrel, G.; Granet, C. & Miossec, P. (2005) Contribution of tumour necrosis factor alpha and interleukin (IL) 1beta to IL6 production, NF-kappaB nuclear translocation, and class I MHC expression in muscle cells: in vitro regulation with specific cytokine inhibitors. *Ann Rheum Dis.* 64(9):1257-62.

- Chiappino, M.L.; Nichols, B.A. & O'Connor, G.R. (1984). Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J Protozool* 31, 288-292.
- Chuenkova, M. V.; Furnari, F. B.; Cavenee, W. K. & Pereira, M. A. (2001) Trypanosoma cruzi trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(17):9936-41.
- Christie, G. R.; Williams, D. J.; Macisaac, F.; Dickinson, R. J.; Rosewell, I. & Keyse, S. M. (2005) The dual-specificity protein phosphatase DUSP9/MKP-4 is essential for placental function but is not required for normal embryonic development. *Mol Cell Biol*. 25(18):8323-33.
- Cleary, M. D.; Singh, U.; Blader, I. J.; Brewer, J. L. & Boothroyd, J. C. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell*. 1(3):329-40.
- Coppens, I & Joiner, K. A. (2001). Parasite–host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? *Exp. Rev. Mol. Med*. 15 January, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002277h.htm>
- Coppens, I. (2006). Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cellular Microbiology* 8(1), 1-9.
- Crewther, P. E.; Culvenor, J. G.; Silva, A., Cooper, J. A. & Anders, R. F. (1990). *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitol*. 70:193–206.
- De Belle, I.; Wu, J. X.; Sperandio, S.; Mercola, D. & Adamson, E. D. (2003) In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr1. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 14306-14312.
- De Grado, M.; Rosenberger, C. M.; Gauthier, A.; Vallance, B. A. & Finlay, B. B. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect Immun*. 69(10):6217-24.
- De Melo, E. J.; de Carvalho, T. U. & de Souza, W. (1992). Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* 17, 311-317.

- DeRisi, J. L.; Lyer, V. R. & Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on genome scale. *Science* 278:680-686.
- Desmonts, G. & Couvreur, J. (1974) Congenital toxoplasmosis. A prospective study on 378 pregnancies. *New Engl. J. Méd.* 290: 1110-1116.
- Dias, R. A.; Navarro, I. T.; Ruffolo, B. B.; Bugni, F. M.; Castro, M. V.; Freire, R. L. (2005) *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Parana State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 47(4):185-9.
- Djurkovic-Djakovic, O. & Milenkovic, V. (2001). Murine Model Of Drug-Induced Reactivation Of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozool.* 40: 99 – 106.
- Dobrowolski, J. M. & Sibley, L. D. 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84:933–939.
- Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 26:163–173.
- Dubey, J. P. (1991) Toxoplasmosis—an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* (22) Suppl:88-92. Review.
- Dubey, J. P.; Lindsay, D. S. & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267-299.
- Dubey J. P. & Thulliez, P. (1993) Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.* 54(2):270-3.
- Dubremetz, J. F. & Torpier G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an *Eimerian sporozoite* (Protozoa, Coccidia). *J. Ultrastruct. Res.* 62:94–109.
- Duggan, D. J.; Bittner, M.; Chen, Y.; Meltzer, P.. & Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21(1 Suppl):10-14.
- Duriez, C.; Moyret-Lalle, C.; Falette, N.; El-Ghissassi, F. & Puisieux, A. (2004) BTG2, its family and its tutor. *Bull Cancer.*;91(7-8):E242-53.
- Dvorak, J. A. & Crane, M. S. J. (1981). Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science* 214:1034–1036.
- Eisen, M. B.; Spellman, P. T.; Brown, P. O. & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. Dec* 8;95(25):14863-8.

- Eisenberg, D.; Marcotte, E. M.; Xenarios, I. & Yeates, T. O. (2000). Protein function in the post-genomic era. *Nature* 405:823-826.
- Endo, T.; Sethi, K. K. & Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp. Parasitol.* 53:179–188.
- Esclatine, A.; Taddeo, B. & Roizman, B. (2004) Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. *J Virol.*;78(16):8582-92.
- Eva, L; Peter, F; V. Nathan V, S. & Hong W. (2005) Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science* 118, 1209-1222.
- Fechir, M.; Linker, K.; Pautz, A.; Hubrich, T.; Forstermann, U.; Rodriguez-Pascual, F. & Kleinert, H. (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol.* 67(6):2148-61.
- Ferreira, A. W. & Ávila, S. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001, 278-288p.
- Few, A. P.; Lautermilch, N. J.; Westenbroek, R. E.; Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2005) Differential regulation of CaV2.1 channels by calcium-binding protein 1 and visinin-like protein-2 requires N-terminal myristoylation. *J Neurosci.* 27;25(30):7071-80.
- Fleetwood, A. J.; Cook, A. D. & Hamilton, J. A. (2005) Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev Immunol.* 25(5):405-28. Review.
- Forster, T.; Roy, D. & Ghazal, P. (2003). Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures. *J. Endocrinol.* 178(2):195-204.
- Frixione, E.; Mondragon R. & Meza, I. 1996. Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* 34:152–163.
- Fuentes I.; Rubio J. M.; Ramirez C. & Alvar J. (2001). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1566–1570.



- Furtado, G. C.; Cao, Y. & Joiner, K. A. (1992). Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the  $\alpha 6\beta 1$  integrin receptor  $\alpha 6\beta 1$  on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 60:4925–4931.
- Furtado, G. C.; Slowik, M.; Kleinman, H. K. & Joiner, K. A. (1992). Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. *Infect. Immun.* 60:2337–2342.
- Fux, B.; Ferreira, A. M.; Cassali, G. D.; Tafuri, W. L.; Vitor, R. W. A. (2000). Experimental toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 121-126.
- Gagne, S. S. (2001) Toxoplasmosis. *Prim. Care Update Ob. Gyns.* 8(3):122-126.
- Galvan, R. M. L.; Soto, M. J. L.; Velasco, C. O. & Perez, M. R. (1995) Incidence of anti-Toxoplasma antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 28(4):333-7.
- Gavrilescu, L.C. & Denkers, E.Y. (2001). IFN- $\gamma$  overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167, 902–909.
- Gerst J. E. SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. (1999) May *Cell Mol Life Sci.* 55(5):707-34. Review.
- Gomez-Marin, J. E.; Valere, A.; Bonhomme, A.; el'Btaouri, H.; Antonicelli, F.; Burlet, H.; Aubert, D.; Villena, I.; Guenounou, M.; Haye, B. & Pinon, J. M. (1998). Interferon-gamma signal transduction during parasite infection: modulation of MAP kinases in the infection of human monocyte cells (THP1) by *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 20, 631-635.
- Grigg M. E.; Ganatra J.; Boothroyd J. C. & Margolis T. P. (2001). Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184, 633–639.
- Grimwood, J. & Smith, J. E. (1992). *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.* 74:106–111.
- Grimwood, J.; Mineo, J. R. & Kasper, L. H. (1996). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect. Immun.* 64:4099–4104.
- Gross, U. & Pohl. F. (1996) Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219:235–245.

- Guimaraes, A. C.; Kawarabayashi, M.; Borges, M. M.; Tolezano, J. E.; Andrade Junior, H. F. (1993) Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the Sao Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 35(6):479-83.
- Hafid, J.; Flori, P.; Raberin, H. & Sung, R. T. M. (2001) Coparision of PCR, capture ELISA and immunoblotting for detection of *Toxoplasma gondii* in infected mice. *J. Med. Microbiol.* 50(12),1100-1104
- Hakansson, S.; Morisaki, H.; Heuser J. & Sibley, L. D. (1999). Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol. Biol. Cell* 10:3539–3547.
- Halonen, S. K. & Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol* 41, 65-71.
- Haque S.; Hanna S.; Gharbi S.; Franck J.; Dumon H. & Haque A. (1999). Infection of mice by a *Toxoplasma gondii* isolate from an AIDS patient: virulence and activation of hosts' immune responses are independent of parasite genotype. *Parasite Immunol.* 21, 649–657.
- Harada, H.; Taniguchi, T. & Tanaka, N. (1998) The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. *Biochimie.* 80(8-9):641-50.
- Harr, B. & Schlötterer, C. (2006). Comparison of algorithms for the analysis of affymetrix microarray data as evaluated by co-expression of genes in known operons. *Nucleic. Acids. Res.* 23;34(2):e8.
- Heintzelman, M. B. & Schwartzman, J. D. (1997). A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 271:139–146.
- Hochreiter, S.; Clevert, D. A. & Obermayer, K. (2006). A new summarization method for Affymetrix probe level data. *Bioinformatics.* 10
- Hoff, E. F. & Carruthers, V. B. (2002). Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends Parasitol.* 18(6):251-5. Review.
- Howe D. K.; Honore S.; Derouin F. & Sibley L. D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1411–1414.
- Hu, K.; Roos, D. S. & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 18;156(6):1039-50.
- Irizarry, R.; Hobbs, F. C. B.; Beaxer-Barclay, Y.; Antonellis, K.; Scherf, U. & Speed, T. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.

- Isokpehi, R. H. & Hide, W. A. (2003). Integrative analysis of intraerythrocytic differentially expressed transcripts yields novel insights into the biology of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* 2:38-50.
- Jahn R. & Sudhof T. C. Membrane fusion and exocytosis. (1999) *Annu Rev Biochem.* 68:863-911. Review.
- Jaramillo, M.; Plante, I.; Ouellet, N.; Vandal, K.; Tessier, P. A. & Olivier, M. (2004) Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *J Immunol.* 172(5):3101-10.
- Jedd, G., Mulholland, J. and Segev, N. (1997). Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* 137, 563-580.
- Jin, R.; De Smaele, E.; Zazzeroni, F.; Nguyen, D. U.; Papa, S.; Jones, J.; Cox, C.; Gelinas, C. & Franzoso, G. (2002) Regulation of the gadd45beta promoter by NF-kappaB. *DNA Cell Biol.* 21(7):491-503.
- Joiner, K. A.; Fuhrman, S. A.; Miettinen, H. M.; Kasper, L. H. & Mellman, I. (1990) *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science.* 249(4969):641-6.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F. and Segev, N. (2000). The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol Biol. Cell* 11, 4403- 4411.
- Junutula J. R.; De Maziere A. M.; Peden A. A.; Ervin K. E.; Advani R. J.; van Dijk S. M.; Klumperman J. & Scheller R. H.. (2004) Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol Biol Cell.* 15(5):2218-29.
- Kardami, E. (1990) A potential new role for bFGF in host-parasite interactions. *Growth Factors.* 4(1):61-8.
- Kasper, L. H. & Mineo, J. R. (1994). Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today* 10:184-188.
- Kasper, L.; Buzoni-Gatel, D.; Boothroyd, J.; Grigg, M.; Dutta, C. & Mennechet, F. Oral toxoplasmosis: a murine model for human IBD? In: Abstracts of the International Congress on Toxoplasmosis (Freising, Germany, 2001).
- Kawauchi, J.; Zhang, C.; Nobori, K.; Hashimoto, Y.; Adachi, M. T.; Noda, A.; Sunamori, M. & Kitajima, S. (2002) Transcriptional repressor activating transcription factor 3 protects human

- umbilical vein endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis through down-regulation of p53 transcription. *J Biol Chem.* Oct 11;277(41):39025-34.
- Kempf, M. C.; Delauw, C. M. F.; Deslee, D.; Gross, U.; Herrman, T. & Sutton, P. (1999) Different manifestation of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. *Med. Microbiol. Immunol.(Berl)*vol. 187(3):137-142.
- Kennell, J. A.; Richards, N. W.; Schaner, P. E. & Gumucio, D. L. (2001) cDNA cloning, chromosomal localization and evolutionary analysis of mouse vacuolar ATPase subunit D, Atp6m. *Cytogenet Cell Genet.* 92(3-4):337-41.
- Kessler, R.; Zacharova-Albinger, A.; Laursen, N. B.; Kalousek, M. & Klemenz, R. (1999) Attenuated expression of the serum responsive T1 gene in ras transformed fibroblasts due to the inhibition of c-fos gene activity. *Oncogene* 4;18(9):1733-44.
- Khan, I. A.; Matsuura, T.; Fonseka, S. & Kasper, L. H. (1996) Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1-/- mice. *J Immunol.* 15;156(2):636-43.
- Kim, K. (2004). Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa *Acta Tropica* 91 69–81.
- Kim, K.; Soldati, D. & Boothroyd, J. C. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* 262:911–914.
- Kimura, T.; Sakisaka, T.; Baba, T.; Yamada, T. & Takai, Y. (2006) Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the hepatocyte growth factor-induced endocytosis of E-cadherin. *J Biol Chem.* 281(15):10598-609.
- King, C. A. (1988). Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol. Today* 4:315–319.
- Kissinger, J. C.; Gajria, B.; Li, L.; Paulsen, I. T. & Roos, D. S. (2003). ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic. Acids. Research* 31(1):234-236.
- Kobayashi, S. D.; Voyich, J. M.; Braughton, K. R. & DeLeo, F. R. (2003) Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 170(6):3357-68.
- Korn, E. D. & Hammer, J. A. (1988). Myosins of nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17:23–45.

- Krieger, M. A. & Goldenberg, S. (1998). Representation of differential expression: A new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. *Parasit. Today* 14(4):163-166.
- Krones-Herzig, A.; Adamson, E. & Mercola, D. (2003) Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *PNAS*, v. 100, 3233-38.
- Kumagai, T.; Miki, T.; Kikuchi, M.; Fukuda, T.; Miyasaka, N.; Kamiyama, R. & Hirosawa, S. (1999) The proto-oncogene Bcl6 inhibits apoptotic cell death in differentiation-induced mouse myogenic cells. *Oncogene* 18(2):467-75.
- Kumar, M. & Mitra, D. (2005) Heat shock protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication. *J Biol Chem.* 280(48):40041-50.
- Labalette, P.; Delhaes, L.; Margaron, F.; Fortier, B. & Rouland, J. F. (2002) Ocular toxoplasmosis after the fifth decade. *Am J Ophthalmol.* 133(4):506-515
- Lai, K. M. & Pawson, T. (2000) The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev* 14(9):1132-45.
- Lee, A.; Westenbroek, R. E.; Haeseleer, F.; Palczewski, K.; Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2002) Differential modulation of Ca(v)2.1 channels by calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-binding protein 1. *Nat Neurosci.*5(3):210-7.
- Lehner, M. D.; Schwoebel, F.; Kotlyarov, A.; Leist, M.; Gaestel, M. & Hartung, T. (2002) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 168(9):4667-73.
- Li, C. & Wong, W. H. (2001 a). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 31–36.
- Li, C. & Wong, W. H. (2001 b). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol.*, 2,(8):RESEARCH0032
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257(5072):967-71.
- Lin, L. L.; Wartmann, M.; Lin, A.Y.; Knopf, J. L.; Seth, A. & Davis, R. J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72, 269-278.

- Lin, Y.; Zhu, X.; McLntee, F. L.; Xiao, H.; Zhang, J.; Fu, M. & Chen, Y. E. (2004) Interferon regulatory factor-1 mediates PPARgamma-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(2):257-63.
- Lindsay, D. S.; Mitschler, R. R.; Toivio-Kinnucan, M. A.; Upton, S. J, Dubey J. P. & Blagburn, B. L. (1993). Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Am J Vet Res* 54, 1663-1667.
- Lipshutz, R. J.; Fodor, S. P.; Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide array. *Nat. Genet.* 21(1 Suppl):20-44.
- Liu, J.; Rich, C. B.; Buczek-Thomas, J. A.; Nugent, M. A.; Panchenko, M. P. & Foster, J. A. (2003) Heparin-binding EGF-like growth factor regulates elastin and FGF-2 expression in pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285(5):L1106-15.
- Liu, X. W.; Bernardo, M. M.; Fridman, R. & Kim, H. R. (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem.* 278(41):40364-72.
- Lockhart, D. J. & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405(6788):827-836.
- LoVerde, P. T.; Carvalho-Queiroz, C. & Cook, R. (2004) Vaccination with antioxidant enzymes confers protective immunity against challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(5 Suppl 1):37-43. Review
- Lovett, J. L. & Sibley, L. D. (2003) Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J Cell Sci.* 116(Pt 14):3009-16.
- Luchtan, M.; Warade, C.; Weatherly, D. B.; Degrave, W. M.; Tarleton, R. L. & Kissinger, J. C. (2004). TcruziDB: an integrated *Trypanosoma cruzi* genome resource. *Nucleic. Acids. Res.* 32:344-346.
- Luder, C. G. & Gross, U. (2005) Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 289:219-37. Review.
- Magdesian, M. H.; Giordano, R.; Ulrich, H.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Schumacher, R. I.; Colli, W. & Alves, M. J. (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem.* 276(22):19382-9.

- Magno, R. C.; Straker, L. C.; De Souza, W. & Attias, M. (2005). Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal.* (2):166-74.
- Makkinje, A.; Quinn, D. A.; Chen, A.; Cadilla, C. L.; Force, T.; Bonventre, J. V. & Kyriakis, J. M. (2000) Gene 33/Mig-6, a transcriptionally inducible adapter protein that binds GTP-Cdc42 and activates SAPK/JNK. A potential marker transcript for chronic pathologic conditions, such as diabetic nephropathy. Possible role in the response to persistent stress. *J Biol Chem* 9;275(23):17838-47.
- Manger, I. D.; Hehl, A. B. & Boothroyd, J. C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* 66:2237–2244.
- Mantamadiotis, T.; Lemberger, T.; Bleckmann, S. C.; Kern, H.; Kretz, O. Martin Villalba, A.; Tronche, F.; Kellendonk, C.; Gau, D.; Kapfhammer, J.; Otto, C.; Schmid, W. & Schütz, G. (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 31(1):47-54.
- McCabe, R. E. & Oster, S. (1989). Current recommendations and future prospects in the treatment of toxoplasmosis. *Drugs* 38, 973-987.
- McLeod, R.; Eisenhauer, P.; Mack, D.; Brown, C.; Filice, G. & Spitainy, G.. (1989). Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 142:3247–3255.
- Mehlhorn, H. & Frenkel, J. K. (1980) Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris* and *Hammondia hammondia* in skeletal muscle of mice. *J. Parasitol.* 66(1):59-67.
- Mellman, I.; Fuchs, R. & Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55:663–700.
- Mercer, J. A.; Seperack, P. K.; Strobel, M. C.; Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat color locus. *Nature* 349:709–713.
- Mevelec, M. N.; Bout, D.; Desolme, B.; Marchand, H.; Magne, R.; Bruneel, O. & Buzoni-Gatel, D. (2005) Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine.* 23(36):4489-99.

- Michel, R.; Schupp, K.; Raether, W. & Bierther, F. W. (1980) Formation of a closejunction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int J Parasitol* 10, 309-313.
- Milde-Langosch, K. (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer*. 41(16):2449-61.
- Mineo, J. R. & Kasper, L. H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol*. 79:11–20.
- Mineo, J. R.; McLeod, R.; Mack, D.; Smith, J.; Khan, I. A.; Ely, K. H. & Kasper, L. H. (1993). Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol*. 150:3951–3964.
- Mir, K. U. (2000). The hypothesis is there is no hypothesis. The microarray Meeting, Scottsdale, Arizona, USA, 22-25 September 1999. *Trends Genet*. 16(2):63-4.
- Mooseker, M. S. & Cheney, R. E. (1996). Unconventional myosins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 11:633–675.
- Mordue D. G. & Sibley L. D. (2003). A novel population of Gr-1+ activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J. Leukoc. Biol*. 74, 1015–1025.
- Mordue D. G.; Monroy F.; La Regina M.; Dinarello C. A. & Sibley L. D. (2001) Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol*. 167, 4574–4584.
- Moroz, O. V.; Antson, A. A.; Grist, S. J.; Maitland, N. J.; Dodson, G. G.; Wilson, K. S.; Lukanidin, E. & Bronstein, I. B. (2003) Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 59(Pt 5):859-67.
- Morrison, D. A. & Ellis, J. T. (2003). The design and analysis of microarray experiments: applications in parasitology. *DNA Cell Biol*. 22(6):357-94.
- Morrisette, N. S.; Murray, J. M. & Roos, D. S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci*. 110:35–42.
- Murray, S. A.; Carver, E. A. & Gridley, T. (2006) Generation of a Snail1 (Snai1) conditional null allele. *Genesis*. 44(1):7-11.
- Nakaar, V.; Ngo, H. M.; Aaronson, E. P.; Coppens, I.; Stedman, T. T. & Joiner, K. A. (2003). Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci*. 116:2311–2320.



- Neef, R.; Kuske, M. A.; Prols, E. & Johnson, J. P. (2002) Identification of the Human PHLDA1/TDAG51 Gene: Down-Regulation in Metastatic Melanoma Contributes to Apoptosis Resistance and Growth Deregulation. *Cancer Res* 62(20):5920-9.
- Neves, D. P.; Melo, A. L.; Genaro, O. & Linardi, P. M. Parasitologia humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 147-156p.
- Ngo, H. M.; Hoppe H. C. & Joiner K. A. (2000). Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol.* 10:67–72.
- Nichols, B. A. & O'Connor, G. R. (1981) Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab Invest* 44, 324-335.
- Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34:217–226.
- Nichols, B. A., Chiappino M. L. & Pravesio, C. E. N. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 80:91–98.
- Nichols, B. A.; Chiappino, M. L. & O'Connor G. R.. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83:85–98.
- Nishiya, K.; Norose, K.; Aosai, F.; Chen, M.; Mun, H. S.; Kang, H. K.; Miyazaki, M. & Yano, A. (2005) Heat stress-induced modulation of host defense against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Parasitol.* 91(3):702-6.
- Ogino, N. & Yoneda, C. (1966). The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Arch. Ophthalmol.* 75:218–227.
- Oliveira, L. M. B.; Jones, J. L.; Silva, J. A.; Alves, C. C.; Orefice, F. & Addiss, D. G. (2003) Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1)55-62.
- Oliver, L. (2002). Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? *The Journal of Infectious Diseases* 185:S96-S101.
- Ortega-Barria, E. & Boothroyd, J. C. (1999). A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J. Biol. Chem.* 274:1267–1276.
- Otani, K.; Han, D. H.; Ford, E. L.; Garcia-Roves, P. M.; Ye, H.; Horikawa, Y.; Bell, G. I.; Holloszy, J. O. & Polonsky, K. S. (2004) Calpain System Regulates Muscle Mass and Glucose Transporter GLUT4 Turnover. *J Biol Chem* 279(20):20915-20.

- Panda, S.; Sato, T. K.; Hampton, G. M. & Hogenesch, J. B. (2003). An array of insights: application of DNA chip technology in study of cell biology. *Trends Cell Biol.* 13(3):151-6.
- Pandley, A. & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.
- Paznekas, W. A.; Okajima, K.; Schertzer, M.; Wood, S. & Jabs, E. W. (1999) Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). *Genomics.* 62(1):42-9.
- Pielou, E. C. (1984). The Interpretation of Ecological Data: A Primer on Classification and Ordination. John Wiley & Sons, New York. 263 p. Capítulo 2.
- Poupel, O.; Boleti, H.; Axisa, S.; Couture-Tosi, E. & Tardieux, I.. (2000). Toxofilin, a novel actin-binding protein from toxoplasma gondii, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol. Biol. Cell* 11:355–368.
- Pouple, O. & Tardieux, I.. (1999). *Toxoplasma gondii* motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. *Microbes Infect.* 1:653–662.
- Prado, P. T. C. & Del Bel, E. A. (1998) C-fos, an immediate early gene as a neuromarker for nociception. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 424-433 .
- Prevot, D.; Morel, A. P.; Voeltzel, T.; Rostan, M. C.; Rimokh, R.; Magaud, J. P. & Corbo, L. (2001) Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J Biol Chem.* 30;276(13):9640-8.
- Prevot, D.; Voeltzel, T.; Birot, A. M.; Morel, A. P.; Rostan, M. C.; Magaud, J. P. & Corbo, L. (2000) The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 147-153.
- Prochet-Hennere, E. & Nicolas, G. (1983). Are rhoptries of Coccidia really extrusomes? *J. Ultrastruct. Res.* 84:194–203.
- Puntschart, A.; Wey, E.; Jostarndt, K.; Vogt, M.; Wittwer, M.; Widmer, H. R.; Hoppeler, H. & Billeter, R. (1998) Expression of fos and jun genes in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol.*274(1):129-37.
- Que, X.; Wunderlich, A.; Joiner, K. A. & Reed, S. L. (2004). Toxopain-1 is critical for infection in a novel chicken embryo model of congenital toxoplasmosis. *Infect Immun.* 72(5):2915-21.

- Robben P. M.; Mordue D. G.; Truscott S. M.; Takeda K.; Akira S. & Sibley L. D. (2004). Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172, 3686–3694.
- Robert, R.; DeLaJarrige, P. L.; Mahaza, C.; Cottin, J.; Marot-Leblond, A. & Senet, J. M.. (1991). Specific binding of neoglycoproteins to *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Infect. Immun.* 59:4670–4673.
- Roberts, C. W. & Alexander, J. (1992). Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology* 104: 19-23.
- Russell, D. G. & Burns, R. G. (1984). The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J. Cell Sci.* 65:193–207.
- Russell, D. G. & Sinden R. E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of Coccidian sporozoites. *J. Cell Sci.* 50:345–359.
- Ryning, F. W. & Remington, J. S. (1978). Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. *Infect. Immun.* 20:739–743.
- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Zhang, L., Schieltz, D., Yates, J. R., III, Abeliovich, H. and Ferro-Novick, S. (1998). TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J.* 17, 2494-2503.
- Sacher, M.; Barrowman, J.; Wang, W.; Horecka, J.; Zhang, Y.; Pypaert, M. & Ferro-Novick, S. (2001). TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol Cell.* 7, 433-442.
- Saeij J. P. J; Boyle J. P and Boothroyd J. C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* e their specific interactions with the infected host *TRENDS in Parasitology* Vol.21 No.10
- Sakaue, M.; Adachi, H.; Jetten, A. M. (1999) Post-transcriptional regulation of MyD118 and GADD45 in human lung carcinoma cells during 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2- naphthalene carboxylic acid-induced apoptosis. *Mol Pharmacol.* 55(4):668-76.
- Sasajima, H.; Nakagawa, K. & Yokosawa, H. (2002) Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are degraded by the ubiquitin-protosome system. *European Journal of Biochemistry*, 269: 3596-3604.

- Saucedo-Cardenas, O.; Quintana-Hau, J. D.; Le, W. D.; Smidt, M. P.; Cox, J. J.; De Mayo, F.; Burbach, J. P. & Conneely, O. M. (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 31;95(7):4013-8.
- Servillo, G.; Della Fazia, M. A. & Sassone-Corsi, P. (1998) Transcription factor CREM coordinates the timing of hepatocyte proliferation in the regenerating liver. *Genes Dev* 12(23):3639-43.
- Schade B. & Fischer H. G. (2001) *Toxoplasma gondii* induction of interleukin-12 is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype. *Vet. Parasitol.* 100: 63–74.
- Scharton-Kersten, T.; Nakajima, H.; Yap, G.; Sher, A. & Leonard, W. J. (1998). Infection of mice lacking the common cytokine receptor gamma-chain (gamma(c)) reveals an unexpected role for CD4+ T lymphocytes in early IFN-gamma-dependent resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 160:2565-2569.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
- Schwab, J. C.; Afifi, M.; Pizzorno, G.; Handschumacher, R. E. & Joiner, K. A. (1995) *Toxoplasma gondii* tachyzoites possess an unusual plasma membrane adenosine transporter. *Mol Biochem Parasitol* 70, 59-69.
- Schwab, J. C.; Beckers, C. J. M. & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:509–513.
- Schwartzman, J. D. & Pfefferkorn, E. R. (1983). Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the Coccidian, *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 30:657–661.
- Scorza, T.; D'Souza, S.; Laloup, M.; Dewit, J.; De Braekeleer, J.; Verschueren, H.; Vercammen, M.; Huygen, K. & Jongert, E. (2003). A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8+ T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 71:309-316.
- Scott, P. & Trinchieri, G. (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 7:34-40.
- Segev, N. (1991). Mediation of the attachment or fusion step in vesicular transport by the GTP-binding Ypt1 protein. *Science* 252:1553-1556.

- Shaw, M. K. (1995) Mobilization of intrasporozoite Ca<sup>2+</sup> is essential for *Theileria parva* sporozoite invasion of bovine lymphocytes. *Eur J Cell Biol* 68, 78-87.
- Sheng, M. & Sala, C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci.* 24:1-29
- Sibley, L. D. & Krahenbuhl, J. L. (1986). *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell Biol.* 103:867–874.
- Sibley, L. D.; Hakansson, S. & Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.* 8:R12–R14.
- Sibley, L. D.; Niesman, I. R.; Parmley, S. F. & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulovesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 108:1669–1677.
- Sibley, L. D.; Weidner, E. & Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification is blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315:416–419.
- Silva, N. M.; Rodrigues, C. V.; Santoro, M. M.; Reis, L. F.; Alvarez-Leite, J. I. & Gazzinelli, R. T. (2002) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun.* 70(2):859-68.
- Silverman, J. A.; Qi, H.; Riehl, A.; Beckers, C.; Nakaar, V. & Joiner, K. A. (1998) Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J Biol Chem* 273, 12352-12359.
- Sinai, A. P.; Payne, T. M.; Carmen, J. C.; Hardi, L.; Watson, S. J. & Molestina, R. E. (2004) Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 34(3):381-91. Review.
- Sinai, A. P. & Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 154:95–108.
- Sinai, A. P.; Webster, P. & Joiner, K. A. (1997) Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 110: 2117-2128.
- Smith, D. F. & Parsons, M. Molecular biology of parasitic protozoa. Oxford: IRL Press, 1996, 55-74p.

- Souza, W. J.; Coutinho, S. G.; Lopes, C. W.; dos Santos, C. S.; Neves, N. M. & Cruz, A. M. (1987) Epidemiological aspects of toxoplasmosis in schoolchildren residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 82(4):475-82.
- Stewart, M. J. & Vanderberg, J. P. (1988). Malaria sporozoites leave behind gliding trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J. Protozool.* 35:389–93.
- Stolle, K.; Schnoor, M.; Fuellen, G.; Spitzer, M.; Engel, T.; Spener, F.; Cullen, P. & Lorkowski, S. (2005) Cloning, cellular localization, genomic organization, and tissue-specific expression of the TGFbeta1-inducible SMAP-5 gene. *Gene*. 23;351:119-30.
- Stommel, E. W.; Kenneth, H. E.; Schwartzman, J. D. & Kasper, L. H. (1997). *Toxoplasma gondii*: dithiol induced Ca<sup>2+</sup> flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* 87:88–97.
- Subauste, C. S.; Dawson, L. & Remington J. S. (1992). Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 176:1511-1519.
- Sugimoto, K.; Ohata, M.; Miyoshi, J.; Ishizaki, H.; Tsuboi, N.; Masuda, A.; Yoshikai, Y.; Takamoto, M.; Sugane, K.; Matsuo, S.; Shimada, Y. & Matsuguchi, T. A. (2004) Serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J Clin Invest.* 114(6):857-66.
- Suzuki, K.; Nakajima, H.; Ikeda, K.; Maezawa, Y.; Suto, A.; Takatori, H.; Saito, Y. & Iwamoto, I. (2003). IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF- $\alpha$  production in mast cells. *J Exp Med*; 198(11):1717-27.
- Suzuki, Y., K.; Joh, M. A.; Conley, O, F. K. & Remington, J. S. (1991). A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. *Immunology* 74:732–739.
- Takekawa, M. & Saito, H. (1998) A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*. 13;95(4):521-30.
- Tanaka, T.; Ohmura, T. & Hidaka, H. (1983) Calmodulin antagonists' binding sites on calmodulin. *Pharmacology* 26, 249-257.
- Tang, B. L.; Ong, Y. S.; Huang, B.; Wei, S.; Wong, E. T.; Qi, R.; Horstmann, H. & Hong, W. (2001) Oct A membrane protein enriched in endoplasmic reticulum exit sites interacts with COPII. *J Biol Chem*. 26;276(43):40008-17.

- Tokudome, T.; Horio, T.; Yoshihara, F.; Suga, S.; Kawano, Y.; Kohno, M. & Kangawa, K. (2002) Adrenomedullin inhibits doxorubicin-induced cultured rat cardiac myocyte apoptosis via a cAMP-dependent mechanism. *Endocrinology* 143(9):3515-21.
- Vairapandi, M.; Balliet, A. G.; Hoffman, B.; Liebermann, D. A. (2002) GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol.* 192(3):327-38.
- Vega, S.; Morales, A. V.; Ocana, O. H.; Valdes, F.; Fabregat, I. & Nieto, M. A. (2004) Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18(10):1131-43.
- Vidal, M. (2001). A biological atlas of functional maps. *Cell* 104:333-339.
- Virolle, T.; Krones-Herzig, A.; Baron, V.; De Gregorio, G.; Adamson, E. D. & Mercola, D. (2003) Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 11802-10.
- Waller, R. F.; Keeling, P. J.; Donald, R. G.; Striepen, B.; Handman, E.; Lang-Unnasch, N.; Cowman, A. F.; Besra, G. S.; Roos, D. S. & McFadden, G. I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(21):12352-7.
- Wan, Y. Y. & DeGregori, J. (2003) The survival of antigen-stimulated T cells requires NFkappaB-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18(3):331-42.
- Wilkowsky S. E.; Barbieri M. A.; Stahl P. D. & Isola E. L. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 1;291(3):516-21.
- Wu, J. J. & Bennett, A. M. (2005) Essential Role for Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase-1 in Stress-responsive MAP Kinase and Cell Survival Signaling. *J Biol Chem* 280(16):16461-6.
- Wu, Z.; Irizarry, R.; Gentleman, R.; Martinez-Murillo, F. & Spencer, F. (2004). A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Journal of the American Statistical Association* 99(468), 909–917.
- Yang, Y. W. & Speed, T. (2002). Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature Reviews Genetics* 3:579-588.
- Yu, M.; Tong, J. H.; Mao, M.; Kan, L. X.; Liu, M. M.; Sun, Y. W.; Fu, G.; Jing, Y. K.; Yu, L.; Lepaslier, D.; Lanotte, M.; Wang, Z. Y.; Chen, Z.; Waxman, S.; Wang, Y. X.; Tan, J. Z. & Chen, S. J. (1997)

Cloning of a gene (RIG-G) associated with retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells and representing a new member of a family of interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14):7406-11.

Yujiri, T.; Sather, S.; Fanger, G. R. & Johnson, G. L. (1998) Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science*. 282(5395):1911-4.

Zhao, H.; Granberg, F.; Elfineh, L.; Pettersson, U. & Svensson, C. (2003) Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol*. 77(20):11006-15.

Zhao, H.; Granberg, F.; Elfineh, L.; (2003) Pettersson, U. & Svensson, C. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol*. 77(20):11006-15

Zoltan-Jones, A.; Huang, L.; Ghatak, S. & Toole, B. P. (2003) Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem* 14;278(46):45801-10.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)