



ERIKA AFONSO COSTA CORTEZ

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E PARTICIPAÇÃO DE
OSTEOPONTINA DURANTE A INTERAÇÃO TAQUIZOÍTOS DE
Toxoplasma gondii – CÉLULA HOSPEDEIRA**

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E PARTICIPAÇÃO DE
OSTEOPONTINA DURANTE A INTERAÇÃO TAQUIZOÍTOS DE
Toxoplasma gondii – CÉLULA HOSPEDEIRA**

Erika Afonso Costa Cortez

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro

2007

Cortez, Erika Afonso Costa

Estudo da expressão e participação de osteopontina durante a interação taquizoítos de *Toxoplasma gondii* – célula hospedeira. Erika Afonso Costa Cortez – 2007.

XV, 48 p.: il.

Orientadora: Laís de Carvalho

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Célula hospedeira. 3. Osteopontina. 4. Teses. I. Carvalho, Laís. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

ESTUDO DA EXPRESSÃO E PARTICIPAÇÃO DE
OSTEOPONTINA DURANTE A INTERAÇÃO TAQUIZOÍTOS DE
Toxoplasma gondii – CÉLULA HOSPEDEIRA

Erika Afonso Costa Cortez

Orientadora: Prof^a Dra Laís de Carvalho

Prof^a Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de
Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em _____ de _____ de 2007 pela banca Examinadora:

Dr.: _____ Prof.

Dr.: _____ Prof.

Dr.: _____ Prof.

Dr.: _____ Prof.

Dr.: _____ Prof.

Rio de Janeiro
2007

Esse trabalho foi realizado no Laboratório Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob a orientação da Professora Dr^a **LAÍS DE CARVALHO**, e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**).

Para onde quer que o homem
contribua com o seu trabalho,
deixa também algo do seu
coração.

Henryk Sienkiewicz

Aos meus pais, Sonia e Elder, obrigada por terem sempre me incentivado a lutar por meus sonhos. Amo vocês!

Ao Fernando, meu amor, amigo, companheiro, obrigada por seu carinho, dedicação e por estar ao meu lado em todos os momentos!

Agradecimentos

A Deus, a força propulsora de todos os momentos.

- ❖ A Dra **Laís de Carvalho**, professora adjunto de Histologia e Embriologia e chefe do Laboratório Cultura de Células do DHE/UERJ, que sempre me orientou na pesquisa e também na vida. Obrigada por acreditar e investir em mim ao longo desses oito anos, contribuindo para que eu alcançasse mais um objetivo!
- ❖ A amiga **Ana Carolina Stumbo**, bióloga do Laboratório Cultura de Células do DHE/UERJ, obrigada pela co-orientação, paciência e apoio indispensáveis no dia-a-dia.
- ❖ A Dra **Helene Santos Barbosa**, pesquisadora titular da FIOCRUZ e colaboradora incansável. Obrigada por estar sempre disposta a nos ajudar, enriquecendo nossos trabalhos.
- ❖ A Dra **Thereza Christina Barja-Fidalgo**, professora adjunto de Farmacologia da UERJ, obrigada pelos ensinamentos e colaboração nos experimentos de Biologia molecular.
- ❖ Ao Dr **Luís Cristóvão Porto**, professor titular de Histologia e Embriologia da UERJ, obrigada pela colaboração durante a realização desse trabalho.
- ❖ A Dra **Maria das Graças Henriques**, pesquisadora titular da FIOCRUZ, obrigada por nos permitir utilizar o Microscópio de varredura confocal a laser, ferramenta indispensável à realização desse trabalho.

- ❖ Ao amigo **Carlos Alberto Rodrigues**, operador do Microscópio de varredura confocal a laser da FIOCRUZ, obrigada pela paciência e tranqüilidade na aquisição das imagens.
- ❖ Ao Dr. **Jorge José de Carvalho**, professor adjunto de Histologia e Embriologia e diretor do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, obrigada pelo apoio e incentivo à pesquisa.
- ❖ A Dra **Patrícia Cristina Lisbôa da Silva**, professora visitante de Fisiologia da UERJ, obrigada pela revisão primorosa desse trabalho.
- ❖ A amiga **Alessandra Alves Thole**, professora assistente de Histologia e Embriologia da UERJ, obrigada pela alegria e descontração no dia-a-dia.
- ❖ A amiga e aluna de doutorado **Renata Oliveira Pereira**, obrigada por todo apoio e amizade. Mesmo longe, você sempre esteve perto.
- ❖ A amiga e aluna de mestrado **Simone Nunes de Carvalho**, obrigada por estar sempre pronta a ajudar.
- ❖ As alunas de iniciação científica do Laboratório Cultura de Células da UERJ, **Mariana Oliveira, Manoela Carvalho, Juliana Tobar, Aline Santos e Erika Lima**, obrigada pelo apoio indispensável nos experimentos e pelas conversas animadas.
- ❖ A amiga e aluna de doutorado **Roberta Saldanha-Gama**, do Depto de Farmacologia da UERJ, obrigada pelo apoio na realização do Western blotting.
- ❖ A Dra **Christina Gaspar Villela**, do Depto de Farmacologia da UERJ, obrigada pelo apoio na realização do RT-PCR.
- ❖ Ao Dr. **Rodolpho M. Albano**, professor adjunto de Bioquímica da UERJ, obrigada pela colaboração na consulta à data base genômica do *Toxoplasma gondii*.

- ❖ Ao biólogo **Alan César Nunes de Moraes**, obrigada pelo apoio técnico ao Microscópio eletrônico de transmissão, da UERJ.
- ❖ Aos funcionários do Depto de Histologia e Embriologia da UERJ, **Ana Lúcia Rosa Nascimento, Josefa da Silva Alves, Kátia Lima e Mauro Luiz dos Santos**, obrigada pelo suporte imprescindível à realização dos experimentos.
- ❖ Ao médico veterinário **Carlos Eduardo Rodrigues Caetano**, do Laboratório de Cirurgia Experimental da UERJ, obrigada pela doação de camundongos.
- ❖ A todos os **professores do curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental** da UERJ, obrigada pelos ensinamentos que enriqueceram minha formação.
- ❖ A todos os **amigos do Depto de Histologia e Embriologia** da UERJ, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, obrigada.

Lista de siglas e abreviaturas

AMA	Antígeno de membrana Apical
BSA	Bovine Serum Albumine (Albumina de Soro Bovino)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)
GAP	Gliding Associates Proteins (Proteínas associadas ao deslizamento)
GD	Grânulo Denso
GRA	Dense Granule Protein (Proteína do Grânulo Denso)
IVN	Intravacuolar network (Rede intravacuolar)
JM	Junção Móvel
KDa	Kilodaltons
LAMP1	Lysosomal Marker (Marcador de Lisossoma)
MIC	Microneme Protein (Proteína do Micronema)
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo
MyoA	Miosina classe XIV
NaCl	Cloreto de Sódio
OPN	Osteopontina
PBS	Phosphate Buffer Saline (Salina Tamponada)
PVDF	Poly(vinylidene fluoride)-graft-poly(acrylic acid)
RE	Retículo Endoplasmático
RGD	Domínio arginina-glicina-ácido aspártico
RON	Rhoptry Neck Proteins (Proteína do Pescoço das Róptrias)
ROP	Rhoptry Protein (Proteína da Róptria)
RPM	Rotações Por Minuto
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (Transcriptase Reversa – Reação em cadeia da Polimerase)

SAG	GPI-anchored Surface Antigen (Antígeno de Superfície ancorado a GPI)
SFB	Soro Fetal Bovino
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Sulfato Dodecil de Sódio)
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
VP	Vacúolo Parasitóforo

Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	1
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1. Estrutura celular	2
1.2. Estágios infectivos	8
1.3. Ciclo de vida	9
2. Interação <i>Toxoplasma gondii</i> - Célula Hospedeira	10
2.1. Adesão e invasão do <i>T. gondii</i> na célula alvo	12
2.2. Formação do Vacúolo Parasitóforo	14
2.3. Multiplicação do <i>T. gondii</i> no Vacúolo Parasitóforo	16
2.4. Egresso	17
3. Osteopontina	18
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. Obtenção dos parasitos	22
2. Cultivo de macrófagos peritoneais	22
3. Análise da expressão de OPN por microscopia confocal	22
4. Localização da expressão de OPN por Imunocitoquímica ultraestrutural	23
5. Análise da expressão de OPN por Western Blotting	24
6. Análise da expressão de RNAm para OPN por RT-PCR	25
RESULTADOS	27
1. Análise da expressão de OPN por microscopia confocal	27
2. Localização da expressão de OPN por Imunocitoquímica ultraestrutural	27
3. Análise da expressão de OPN por Western Blotting	32
4. Análise da expressão de RNAm para OPN por RT-PCR	32
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ARTIGO ANEXADO	48

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito do filo Apicomplexa que infecta uma grande variedade de hospedeiros, incluindo os humanos. O parasito invade a célula hospedeira por penetração ativa, com a participação das proteínas de suas organelas secretoras durante esse processo. Até o momento, somente um número limitado de proteínas secretoras tem sido descoberto, além disso, as moléculas efetoras envolvidas na invasão e sobrevivência do parasito não estão completamente compreendidas. A osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína adesiva secretada, multifuncional, que contém o domínio arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) de ligação à integrina, que está envolvida em uma variedade de eventos fisiológicos e patológicos, incluindo sinalização e sobrevivência celular. Pela primeira vez, nós demonstramos pelas técnicas de imunofluorescência e imunocitoquímica ultraestrutural que há uma intensa marcação para uma proteína OPN-like nos grânulos densos de taquizoítos de *T. gondii* extracelulares. O western blotting e o RT-PCR confirmaram a expressão de OPN-like nos taquizoítos. Nossos resultados também mostram que após a invasão dos macrófagos, a proteína OPN-like está localizada na membrana do vacúolo parasitóforo. Esses dados sugerem que os grânulos densos secretam uma proteína OPN-like, e nós podemos especular que essa proteína participa durante o processo de interação do parasito com as células hospedeiras.

Abstract

Toxoplasma gondii is an apicomplexan parasite infecting a broad host range, including humans. The parasite invades host cell by active penetration with the participation of its secretory organelles proteins during this process. Until now, only a limited number of secretory proteins have been discovered, and the effectors molecules involved in parasite invasion and survival are not well understood. Osteopontin (OPN) is a multifunctional secreted adhesive glycoposphoprotein containing the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) integrin-binding domain, which is involved in various physiological and pathological events including cell signaling and survival. For the first time we demonstrated by immunofluorescence and immunoelectron microscopy approaches that there is an intense labeling for an OPN-like protein in the dense granules of extracellular *T. gondii* tachyzoites. Western blotting and RT-PCR confirmed this protein expression in tachyzoites. Our results also showed that after macrophage invasion the OPN-like protein is localized at the parasitophorous vacuole membrane. These data suggest that dense granules secrete an OPN-like protein, and we can speculate that this protein participates during the parasite interaction process with host cells.

FIGURA 1: (A) Overlay e (B) Fluorescência de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares imunomarcados com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina. Os parasitos apresentam a expressão de uma proteína OPN-like com um padrão pontual típico de grânulos densos, mostrado em detalhes no inset.

FIGURA 2: (A, C) Overlay e (B, D) Fluorescência de macrófagos infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* por 1h, imunomarcados com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina. A proteína está localizada no pólo anterior de alguns parasitos (cabeça de seta) e também na membrana de alguns vacúolos parasitóforos (setas), mostrado em detalhes no inset.

FIGURA 3: (A, C) Overlay e (B, D) Fluorescência de macrófagos infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* por 24h, imunomarcados com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina. Os parasitos intravacuolares apresentam uma marcação intensa para uma proteína OPN-like no pólo anterior (cabeça de seta). A proteína permanece localizada da membrana do vacúolo parasitóforo (setas).

FIGURA 4: (A, C, E) Microscopia eletrônica de transmissão de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares imunomarcados com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina. (B, D, F) Áreas selecionadas das figuras A, C, E, mostrando em detalhes a localização das partículas de ouro coloidal (10nm) nos grânulos densos (setas).

FIGURA 5: Expressão da proteína OPN-like por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares. (A) Lane 1 mostra o lisado de fibroblastos de fetos de rato apresentando a expressão de OPN (controle positivo). Lanes 2 e 3 mostram duas amostras diferentes de lisados de taquizoítos imunomarcados com o anticorpo primário policlonal anti-osteopontina. (B) Lane 1 mostra o lisado de taquizoítos imunomarcados com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina. A mesma banda de proteína é detectada em todos os lanes. O peso molecular observado é consistente com a mobilidade eletroforética descrita para a OPN.

FIGURA 6: RT-PCR realizado com os primers de osteopontina de murino e beta tubulina de *Toxoplasma gondii* (controle). O gel de agarose mostra a expressão de RNAm para uma proteína OPN-like por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares isolados.

Introdução

1. *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii*, agente da toxoplasmose humana e animal, é um protozoário parasita intracelular obrigatório que possui uma larga distribuição geográfica e é capaz de infectar quase todas as células eucarióticas (Dubey e Beattie, 1988; Sinai e Joiner, 1997; Hill *et al.*, 2005). Esse parasito foi descrito e isolado em 1908, na Tunísia, por Nicole e Manceaux que encontraram o protozoário no cérebro de um roedor africano, o *Ctenodactulus gondii*, o qual forneceu o nome para a espécie do parasito. Independentemente, no Brasil, Splendore encontrou a mesma espécie no cérebro de coelho. O nome do gênero deriva da palavra grega *toxon*, que significa arco e refere-se à forma de crescente ou arco que o parasito apresenta (Nicolle e Manceaux, 1908; Splendore, 1908).

Infecções por *T. gondii* são encontradas na natureza em praticamente todos os mamíferos e amplamente distribuídas entre pássaros e répteis. Como um patógeno humano, o *T. gondii* tem ganhado cada vez mais importância. Trata-se de um parasito sem barreiras geográficas, alcançando em todo o mundo uma taxa de infecção de 30 a 50% . A infecção geralmente é assintomática em indivíduos saudáveis. Seguindo a infecção assintomática, os parasitos podem persistir como cistos dormentes principalmente nos músculos e sistema nervoso. Entretanto, entre indivíduos imunocomprometidos, incluindo transplantados e pessoas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a toxoplasmose é uma causa significativa de morbidade e mortalidade, normalmente na forma de encefalite (Dubey, 2004). A toxoplasmose congênita pode ocorrer após a infecção materna durante a gestação. A

severidade da doença depende do estágio da gestação no qual a infecção ocorre, podendo resultar em abortos espontâneos ou sérias máis-formações (Remington *et al.*, 2001).

Os regimes terapêuticos atuais (sulfadiazina com pirimetamina) não são capazes de erradicar a infecção e aproximadamente 50% dos pacientes não respondem à terapia. Além do mais, essas drogas não são efetivas contra os cistos de *T. gondii*. E ainda, a exposição prolongada a essas drogas causa severa toxicidade no hospedeiro, forçando a interrupção da terapia (Bonfioli e Orefice, 2005).

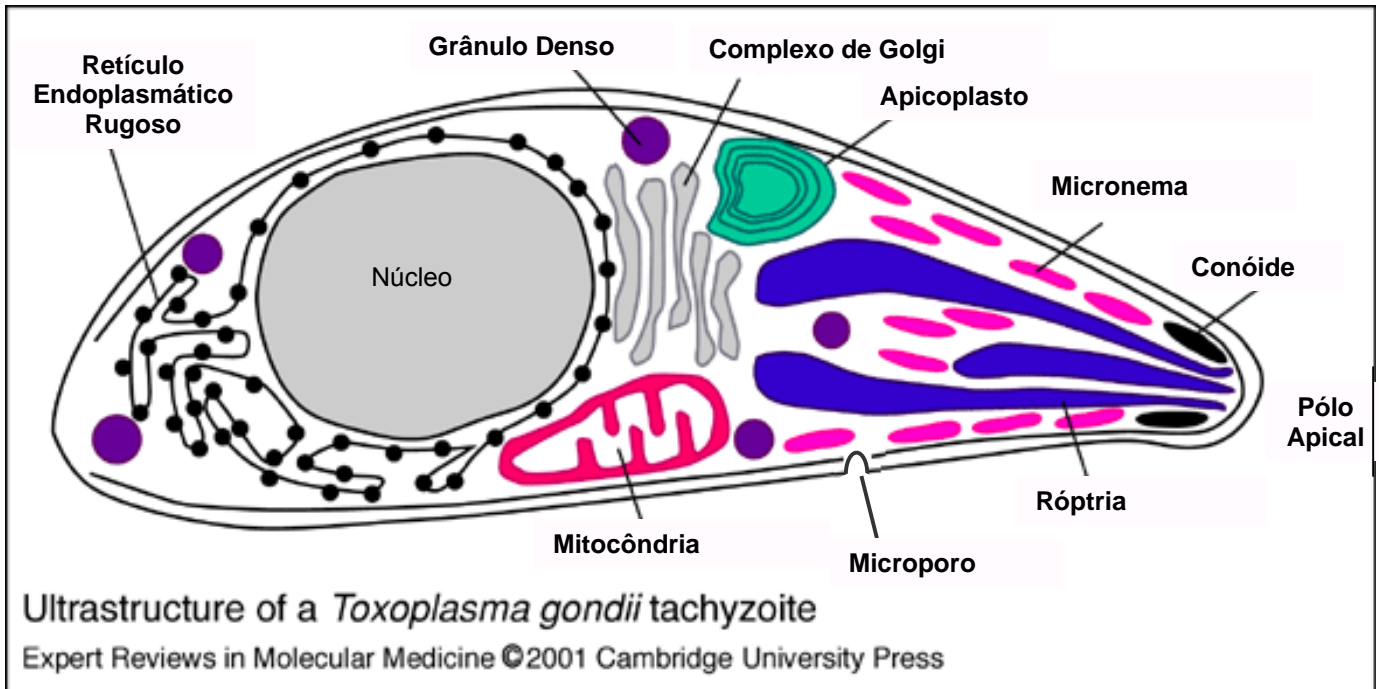
1.1. ESTRUTURA CELULAR

O *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa. Esse filo compreende uma grande variedade de protozoários parasitas, incluindo o *Plasmodium* (agente causador da malária), cuja característica morfológica distinta inclui um grupo de organelas e estruturas do citoesqueleto localizadas no pólo apical (região anterior) da célula, o então denominado “complexo apical”, que confere o nome ao filo. (Dubey *et al.*, 1998; Morrissette e Sibley, 2002). Além das organelas típicas de células eucarióticas como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, o parasito apresenta estruturas especiais: complexo trimembranar (película), conóide, micronemas, róptrias, grânulos densos e apicoplasto (Esquema 1) (Dubey *et al.*, 1998; Joiner e Roos, 2002).

I. Complexo trimembranar

O corpo celular do *T. gondii* é envolvido por uma película constituída por três membranas (complexo trimembranar). A membrana externa, de natureza trilaminar, envolve completamente o parasito. As duas membranas mais internas formam o complexo membranar interno que se apresenta interrompido nas regiões anterior e posterior do parasito, bem como no microporo (estrutura relacionada à endocitose),

constituindo um sistema de cisternas achatadas, altamente associado à microtúbulos (Vivier e Petiprez, 1968; Cintra e de Souza, 1985; Ngo *et al.*, 2000).



Esquema 1: Esquema adaptado da ultra-estrutura de taquizoíta de *T. gondii* (Fonte: fullmal.hgc.jp/tg/docs/toxoplasma.html)

II. Conóide

Na região anterior do parasito encontra-se uma estrutura cilíndrica, o conóide, constituído por anéis conoidais, anéis polares e microtúbulos. Partindo do anel polar inferior, originam-se 22 microtúbulos subpeliculares que, dispendo-se na periferia, logo abaixo da membrana interna, projetam-se para a região posterior do parasito onde terminam livremente. O reconhecimento da superfície da célula hospedeira é feito através do conóide que possui movimento independente em relação ao restante do corpo do parasito, podendo protrar, retrair, girar ou inclinar (De Souza, 1974; Nichols e O'Connor, 1981; Nichols e Chiappino, 1987; Dubey *et al.*, 1998; Black e Boothroyd, 2000; Hu *et al.*, 2006).

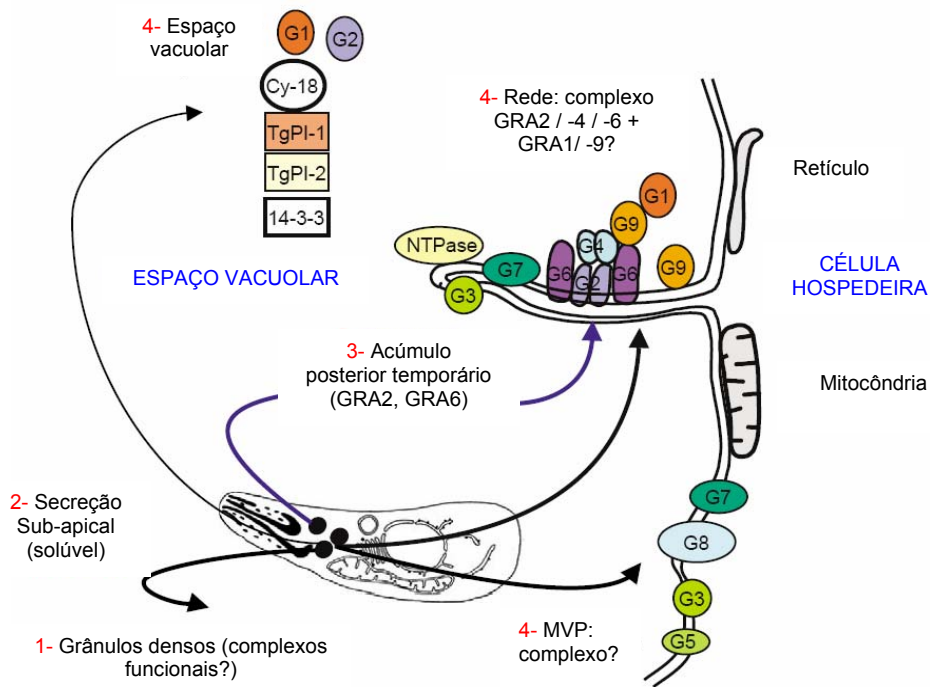
III. Organelas secretoras

O *T. gondii* possui organelas secretoras características do filo Apicomplexa, os **micronemas**, as **róptrias** e os **grânulos densos**. Essas organelas possuem proteínas específicas em seu interior, denominadas MICs, ROPs e GRAs, respectivamente, que são liberadas durante e após a invasão da célula hospedeira (Black e Boothroyd, 2000).

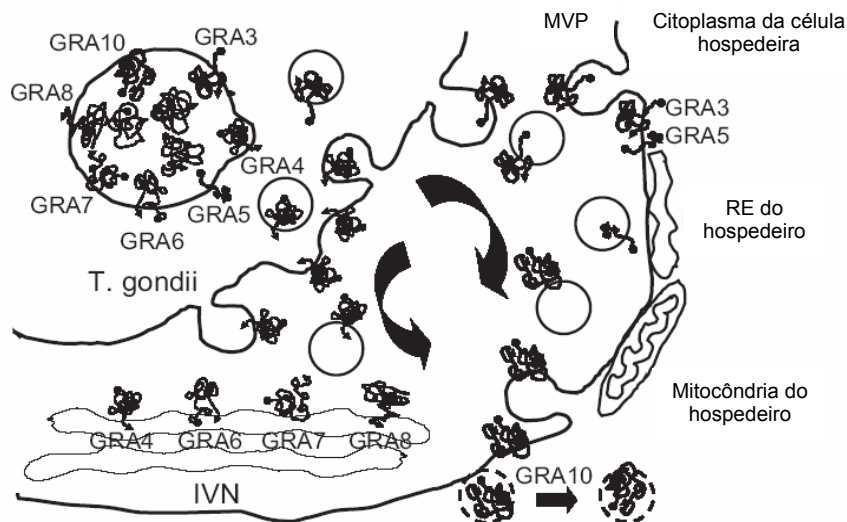
Os **micronemas** são pequenas vesículas em forma de barra, com tamanho médio de 60-160nm, restritas ao terço apical do parasito. As proteínas dos micronemas (MICs) são liberadas na superfície do parasito um pouco antes da invasão da célula hospedeira e exercem importantes papéis no reconhecimento, adesão e penetração da célula. As MICs contêm uma variedade de domínios adesivos incluindo os domínios: integrina-like (MIC2), trombospondina tipo I-like (MIC1 e MIC2), fator de crescimento epidermal-like (MIC3, MIC6, MIC7, MIC8 e MIC9) e lectina-like (MIC3 e MIC8), os quais mediam interações com componentes da superfície da célula hospedeira (Barragan *et al.*, 2005). A diversidade de domínios adesivos combinada com a capacidade das MICs de formarem complexos multiméricos, otimiza a interação do parasito com a superfície de diversos tipos celulares (Brossier e Sibley, 2005).

As **róptrias** são organelas alongadas em forma de clava que se conectam por um pedúnculo ao pólo apical do parasito. Elas apresentam duas regiões distintas: um ducto fino apical e uma porção basal bulbosa, que diferem na composição de proteínas denominadas RONS e ROPs, respectivamente (Ngo *et al.*, 2000; Blackman e Bannister, 2001). A exocitose das róptrias ocorre durante a invasão do parasito na célula hospedeira, e seus conteúdos estão envolvidos no processo de invasão e formação do vacúolo parasitóforo, no qual o parasito se desenvolve (Alexander *et al.*, 2005).

Os **grânulos densos** (GDs) são organelas esféricas de aproximadamente 200nm de diâmetro recobertas por uma membrana única, que se encontram dispersas no citoplasma do parasito (Blackman e Bannister, 2001). Encontrados durante o estágio invasivo dos Apicomplexas, receberam essa denominação devido à sua densidade quando observados ao microscópio eletrônico de transmissão. A secreção dos GDs ocorre na porção subapical do parasito pela fusão com sua membrana plasmática (Mercier *et al.*, 2005) (Esquema 2). Tem sido descrito a existência de dois mecanismos de secreção: o primeiro sendo de forma constitutiva (Liendo *et al.*, 2001), e o segundo mecanismo ocorrendo de forma regulada durante a primeira hora de invasão (Mercier *et al.*, 2005). As proteínas dos grânulos densos (GRAs) formam um grupo de proteínas relativamente pequenas (21 – 41KDa) que desempenham um papel importante na modificação do vacúolo parasitóforo. Atualmente são conhecidas dez proteínas, GRA1 – GRA10, duas isoformas de NTPases além de inibidores de proteases (Ahn *et al.*, 2005) (Tabela 1). Após a secreção no interior do vacúolo parasitóforo, as GRAs se tornam associadas à membrana que delimita o vacúolo (GRA3, -5, -7, -8 e -10) ou à rede intravacuolar de membranas tubulares (GRA2, -3, -4, -6 e -9) (Adjogble *et al.*, 2004; Mercier *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006) (Esquemas 2 e 3). Uma característica interessante comum as GRAs é a diferença observada entre o seu peso molecular teórico, calculado a partir da seqüência de aminoácidos, e o peso molecular da proteína nativa, estimado pela análise em SDS-PAGE de lisado de taquizoítos. Isso sugere potenciais modificações pós-traducionais, como fosforilações e glicosilações (Zinecker *et al.*, 1998; Mercier *et al.*, 2005)



Esquema 2: Alvo específico das proteínas de GDs no VP de taquizoítos. Durante a primeira hora da invasão da célula hospedeira, os GDs são secretados sub-apicalmente. GRA2 e GRA6 se acumulam temporariamente em um bolso invaginado na parte posterior do parasito, onde se associam com estruturas lamelares vacuolares e induzem a sua tubulação. No vacúolo maduro, GRA3, -5, -7 e -8 são detectadas na membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) enquanto que GRA2, -4 e -6 se associam com a rede de membranas e participam na formação de um complexo de proteínas. A GRA9 também deve estar envolvida nesse complexo. GRA1 e NTPases devem se associar fracamente a essas membranas do vacúolo. Uma fração do pool de GRA3 e -7 também se associam com a rede membranar. TgPIs são proteínas solúveis presentes no compartimento vacuolar. A localização exata de Cy-18 e 14-3-3 permanece desconhecida (adaptado de Mercier *et al.*, 2005).



Esquema 3: Secreção das proteínas de GDs. GRA4, -6, -7 e -8 são localizadas na rede intravacuolar (IVN) e participam na interação com componentes da célula hospedeira através da MVP, enquanto que GRA3, -5 e -10 são secretadas na MVP para a interação direta. GRA10 pode ser secretada para fora da MVP e interagir com proteínas nucleares do hospedeiro (adaptado de Ahn *et al.*, 2006).

Protein name (MW)	Characteristics/localisation	References
<i>Toxoplasma</i>		
TgGRA1 (23)	Solúvel no GD e no VP Fracamente associada à IVN	Cesbron-Delauw et al. (198) Atkinson et al. (2001)
TgGRA2 (28)	Alfa hélices anfipáticas IVN	Parmley et al. (1993) Mercier et al. (1993) Ellis et al. (2000)
TgGRA3 (30)	Domínio transmembrana MVP, IVN	Bermudes et al. (1994a) Ossorio et al. (1994) Robben et al. (2002)
TgGRA4 (40/41)	Domínio transmembrana IVN	Mevelec et al. (1992)
TgGRA5 (21)	Domínio transmembrana Homologia à TgGRA6 MVP, EVP	Lecordier et al. (1993)
TgGRA6 (32)	Domínio transmembrana Homologia à TgGRA5 IVN	Lecordier et al. (1995) Liddell et al. (1998) Walsh et al. (2001)
TgGRA7 (29)	Domínio transmembrana MVP, EVP, IVN	Bonhomme et al. (1998) Fischer et al. (1998) Hemphill et al. (1998) Jacobs et al. (1998) Lally et al. (1997)
TgGRA8 (40)	Domínio transmembrana MVP, EVP	Carey et al. (2000)
TgGRA9 (41)	Alfa hélice anfipática IVN	Nockemann et al. (1998) Adjogble et al. (2004)
TgNTPases (67)	Fracamente associada à IVN	Asai et al. (1995) Bermudes et al. (1994b) Asai et al. (1998)
CyP 18 (18)		High et al. (1994)
TgPIs (30)		Pszenny et al. (2000) Pszenny et al. (2002) Morris et al. (2002) Morris et al. (2004)
Tg14-3-3 protein (36/31)		Assossou et al. (2003) Assossou et al. (2004)

Tabela 1: Lista das proteínas de grânulos densos (GRAs) de *Toxoplasma gondii*. PM, peso molecular; EVP, extensão do VP (adaptado de Mercier *et al.*, 2005).

IV. Apicoplasto

O Apicoplasto é uma organela plastídeo-like recentemente descoberta, que está presente na maioria dos apicomplexas. É formado por múltiplas membranas interligadas e está localizado na região anterior do parasito (Kohler *et al.*, 1997; De Souza, 2003). Alguns estudos sugerem que a função do apicoplasto esteja diretamente relacionada à sobrevivência do parasito (Fichera e Roos, 1997; Seeber, 2003). Além disso, tem sido descrito que as vias metabólicas do apicoplasto estão mais relacionadas às vias metabólicas de células procarióticas do que de células

eucarióticas. Dessa forma, o apicoplasto tem sido explorado como um possível alvo terapêutico (Thomsen-Zieger *et al.*, 2003; Kim e Weiss, 2004).

1.2. ESTÁGIOS INFECTIVOS

O *T. gondii* apresenta três estágios infectivos: **taquizoítos**, formas multiplicativas intracelulares; **bradizoítos**, presentes em cistos tissulares; e **esporozoítos**, contidos em oocistos esporulados (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2004).

I. Taquizoítos

Os taquizoítos (do grego *tachos*, que significa velocidade) representam o estágio infectivo do *T. gondii* presente na fase aguda da doença, se multiplicando intracelularmente de forma rápida. Medem cerca de 2 μ m de largura e 6 μ m de comprimento, sendo capazes de infectar a maioria das células do hospedeiro intermediário (homem e animais em geral) e as células do seu hospedeiro definitivo (os felinos), com exceção dos enterócitos (Dubey *et al.*, 1998).

II. Bradizoítos

Os bradizoítos (*bradi* significa lento em grego) se multiplicam lentamente dentro do cisto tissular. Medem cerca de 2 μ m de largura e 7 μ m de comprimento e apresentam as estruturas típicas de células eucarióticas, semelhantes aos taquizoítos, porém com algumas particularidades, tais como grânulos de amilopectina em quantidade. Persistem no hospedeiro por longos períodos, caracterizando a fase crônica da toxoplasmose (Dubey *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2007).

III. Esporozoítos

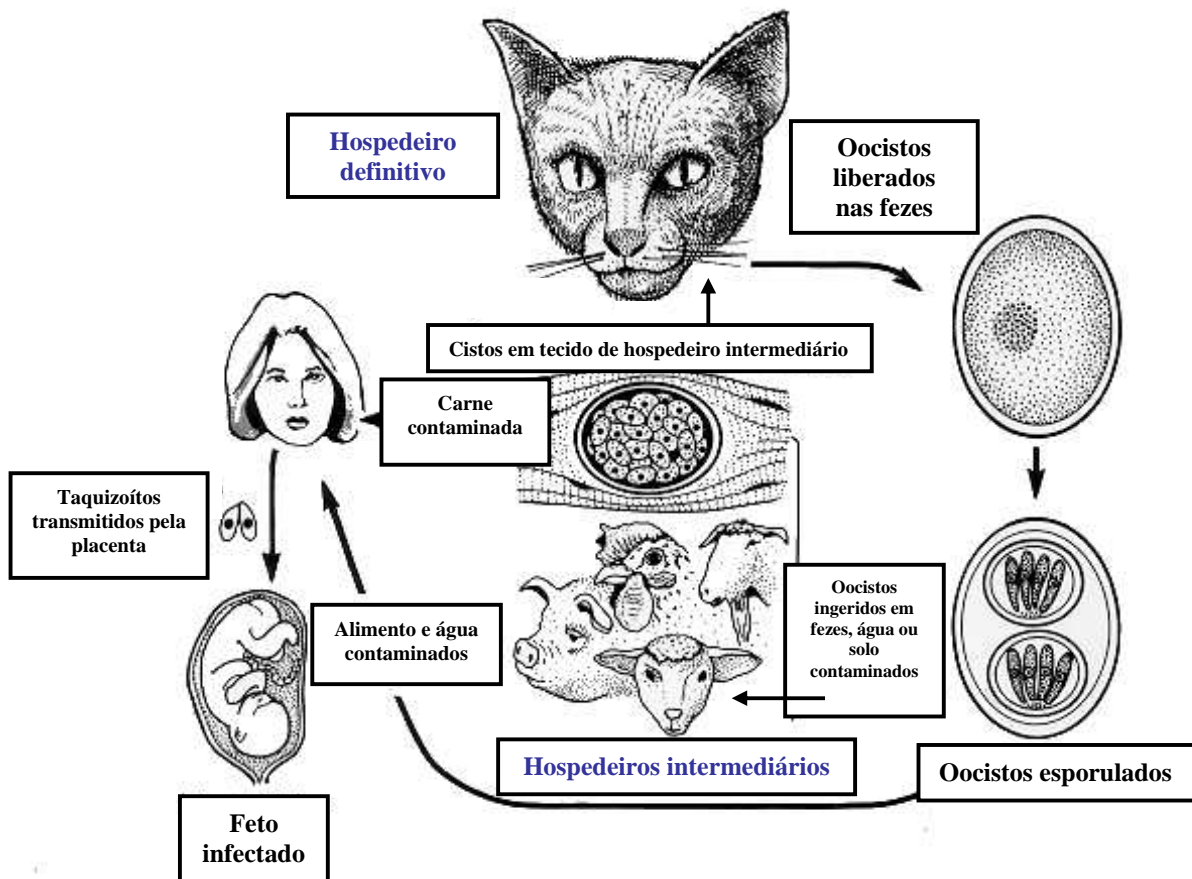
Os esporozoítos medem cerca de 2µm de largura e 7µm de comprimento e estão presentes no oocisto, constituindo o estágio infectivo dos hospedeiros definitivos (Dubey *et al.*, 1996; Dubey, 1997; Dubey *et al.*, 1998).

1.3. CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo e envolve duas fases: uma sexuada e uma assexuada. Membros da família Felidae (gatos domésticos dentre os mais importantes) são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos no ciclo de vida do *T. gondii*, nos quais ocorre a fase sexuada. Após a ingestão de cistos ou oocistos de toxoplasma, estes se rompem no estômago e liberam os bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente. O toxoplasma sofre, então, um ciclo reprodutivo no intestino desse hospedeiro, com os estágios proliferativo e sexual, resultando no desenvolvimento de oocistos. Liberados no ambiente junto com as fezes do felino, esses oocistos, após a esporulação no solo, contêm esporozoítos, capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros intermediários, os quais compreendem a maioria dos animais vertebrados (Dubey, 2002).

Nos hospedeiros intermediários ocorre a fase assexuada, com dois estágios de desenvolvimento: inicialmente, taquizoítos se multiplicam rapidamente, em diferentes tipos celulares até a completa destruição da célula hospedeira. Posteriormente, ocorre a conversão de taquizoítos em bradizoítos, formando cistos tissulares (Dubey *et al.*, 1998; Guimaraes *et al.*, 2007).

A transmissão do parasito pode ocorrer (1º) pela ingestão de oocistos liberados nas fezes de gatos; (2º) pela ingestão de cistos tissulares existentes em carne crua ou mal passada; ou (3º) por via placentária (Dubey, 1994) (Esquema 4).



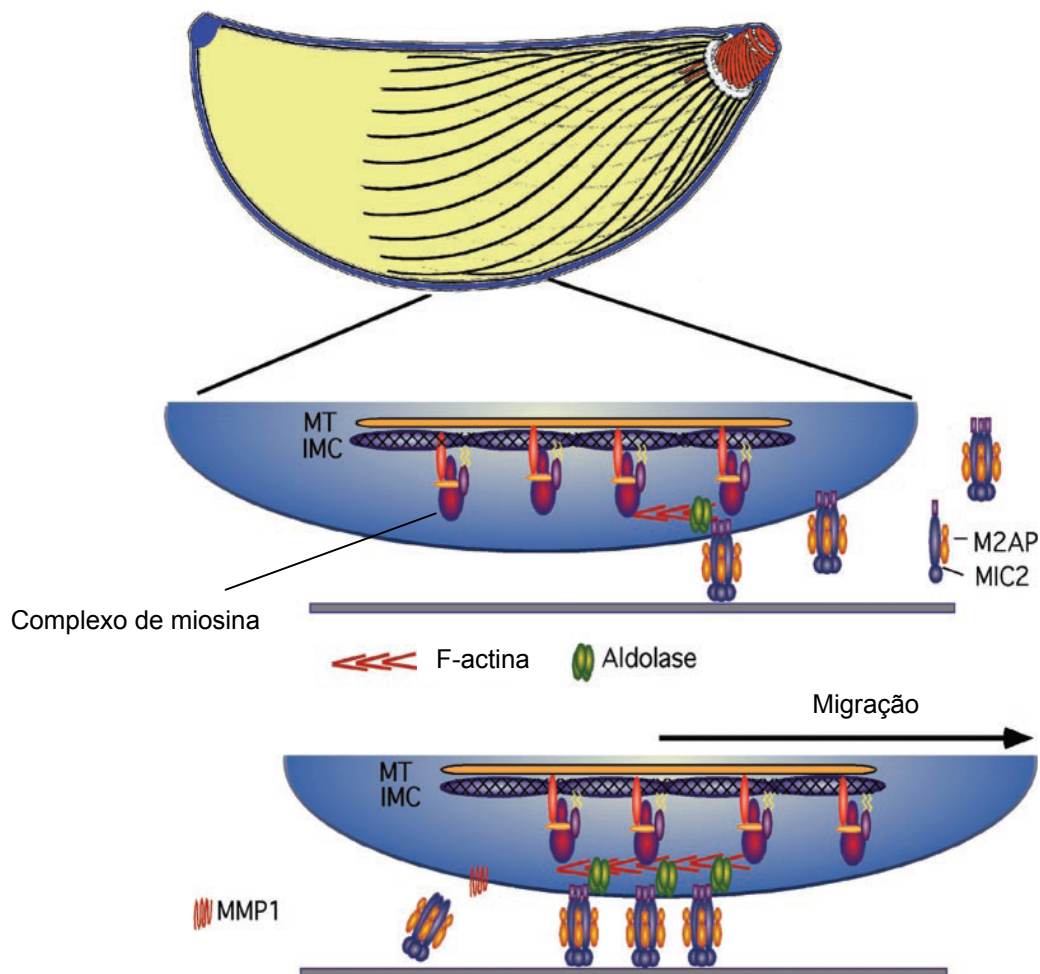
Esquema 4: Esquema das vias de transmissão do *T. gondii* (adaptado de Dubey, 1986).

2. Interação *Toxoplasma gondii* - célula hospedeira

Um evento crítico na vida de qualquer parasito obrigatoriamente intracelular é a infecção da futura célula hospedeira. Embora seja uma estratégia de sobrevivência apresentada por diversos microorganismos patogênicos, acessar o interior da célula alvo não é uma tarefa simples. O *T. gondii* invade a célula hospedeira por um processo ativo, mediado pelo citoesqueleto do parasito, sem que a célula exerça um papel ativo. Diferente da fagocitose, uma estratégia utilizada por outros parasitos intracelulares, como vírus e bactérias, a entrada dos protozoários do filo Apicomplexa ocorre sem alterações no citoesqueleto de actina do hospedeiro. Essa entrada também é

independente do cálcio da célula hospedeira, entretanto, depende de uma via de secreção regulada de cálcio pelo parasito (Jones *et al.*, 1972; Carvalho e de Souza, 1990; Sibley, 2004). O processo de penetração ativa ocorre em cerca de 15 a 20 segundos até que o parasito se encontre no interior de um vacúolo citoplasmático revestido por membrana denominado vacúolo parasitóforo (Morisaki *et al.*, 1995; Stumbo *et al.*, 2002; Carruthers e Boothroyd, 2007).

Os parasitos do filo Apicomplexa apresentam uma forma comum de locomoção dependente do substrato denominada mobilidade por deslizamento (*gliding*), que é usada para a migração tecidual e para a invasão da célula hospedeira. Diferente de outras formas de locomoção, o deslizamento não envolve projeções de pseudópodes ou qualquer outra alteração óbvia na forma celular. Ao invés disso, o deslizamento se sustenta em um intrincado sistema motor linear, localizado entre a membrana plasmática do parasito e o complexo membranar interno (Heintzelman, 2006). A força propulsora é gerada pela miosina classe XIV (MyoA) que é pareada com a miosina de cadeia leve e ligada ao complexo membranar interno por duas proteínas associadas ao deslizamento (GAP45 e GAP50). A actina do parasito também exerce um papel chave nesse sistema, formando microfilamentos curtos de actina (F-actina) durante o deslizamento. Além de se ligar com a miosina, a F-actina se associa com a enzima glicolítica aldolase, que por sua vez, liga o complexo ao domínio citosólico de proteínas adesivas transmembranas presentes na membrana plasmática do parasito (complexo MIC2/M2AP). A exclusiva liberação de adesinas transmembrana do pólo apical e a orientação unidirecional dos microfilamentos de actina suportam um movimento do parasito para frente (Esquema 5).



Esquema 5: O complexo motor de miosina está ancorado ao complexo membranar interno. O complexo de adesinas MIC2/M2AP é descarregado no pólo anterior do parasito. Esse complexo se liga à aldolase, que por sua vez, se liga ao citoesqueleto de actina. O movimento progressivo do complexo F-actina-aldolase-MIC2/M2AP, ao longo da superfície celular impulsiona o parasito para frente. A MIC2 é liberada após o processamento intramembranar, provavelmente mediado pela protease MMP1. (Adaptado de Sibley, 2004).

2.1. ADESÃO E INVASÃO DO *T. gondii* NA CÉLULA ALVO

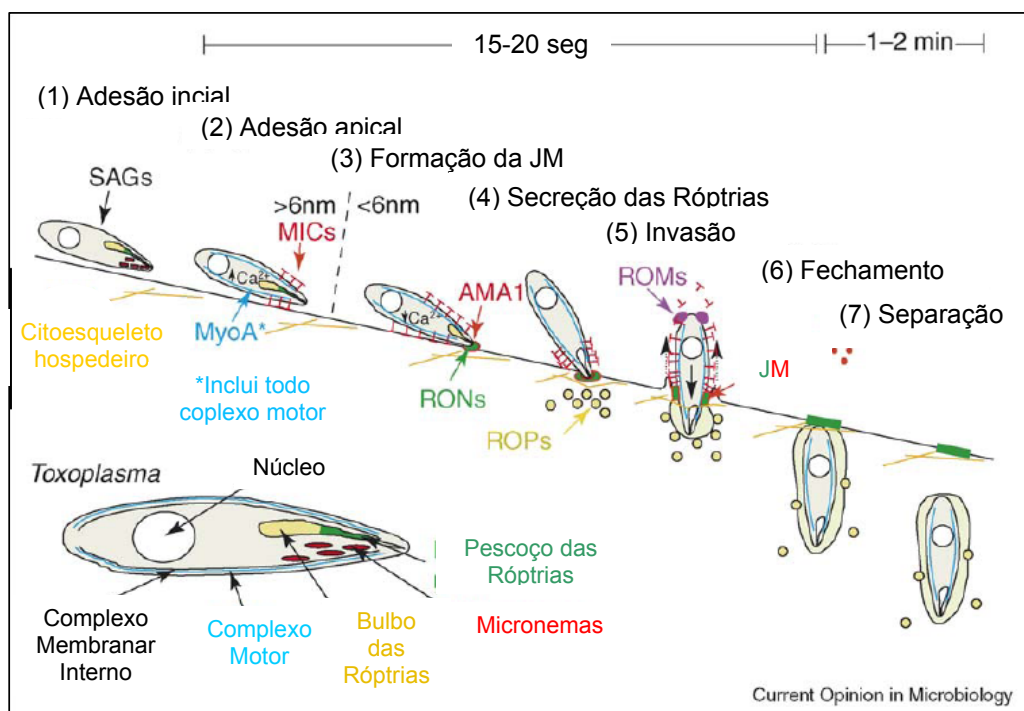
Uma vez que o parasito tenha deslizado sobre o substrato e encontrado uma célula alvo para invadir, a próxima tarefa é se aderir de alguma forma à superfície da célula hospedeira. Diversas proteínas parecem ser utilizadas em cada etapa desse processo, que resulta na formação de uma interface de adesão íntima (Grimwood e Smith, 1996; Alexander *et al.*, 2005).

A superfície dos taquizoítos de *T. gondii* é decorada com uma família de antígenos de superfície ancorados a GPI (SAGs). A abundância e larga distribuição das SAGs na superfície do parasito sugerem que elas realizem uma interação lateral e

de baixa afinidade com a superfície da célula hospedeira (Esquema 6). Especula-se que essa característica permita que o parasito interaja inicialmente com a célula alvo com o intuito de encontrar um ótimo local para a invasão. Essa interação inicial precisa ser reversível, permitindo que o parasito se desprenda caso o tipo celular encontrado ou as condições para a invasão não sejam ideais (Carruthers e Boothroyd, 2007).

A invasão é um processo altamente específico, que consiste de uma seqüência de eventos programados absolutamente essenciais para o estabelecimento de uma infecção produtiva. Para que a adesão ocorra, é necessário que o parasito reconheça algumas macromoléculas específicas na superfície da célula hospedeira. A capacidade do *T. gondii* de infectar quase todos os tipos celulares (Buckley, 1973; Werk, 1985) exclui qualquer proteína específica como receptor e sugere que componentes comuns existentes na membrana plasmática da maioria das células hospedeiras funcionem como receptor para o parasito (Silverman e Joiner, 1997). Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se empenhado na identificação de ligantes do parasito e de receptores da superfície da célula hospedeira que possam estar envolvidos no processo de adesão (Carvalho *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 1993; Grimwood e Smith, 1996; Black e Boothroyd, 2000). Após encontrar um local susceptível para a invasão, o parasito estabelece uma associação íntima, envolvendo sua reorientação para colocar as organelas secretoras apicais em contato com a membrana da célula hospedeira. Em seguida, os micronemas e as rôptrias secretam seus conteúdos (Cesbron-Delauw *et al.*, 1996; Brossier e Sibley, 2005; Henriquez *et al.*, 2005; El Hajj *et al.*, 2006). As proteínas do “pescoço” das rôptrias (RONS) formam um complexo estável com a proteínas dos micronemas, AMA1, assim que são secretadas na superfície do parasito. Esse complexo contribui para a formação de uma estrutura conhecida como junção móvel (JM), onde as membranas plasmáticas da célula hospedeira e do parasito estão

em íntimo contato (Carruthers e Boothroyd, 2007). A JM está associada com uma constrição visível em torno do parasito, que migra do pólo anterior ao pólo posterior durante a invasão. Isso resulta na formação de um vacúolo parasitóforo derivado da invaginação da membrana da célula hospedeira (Alexander *et al.*, 2005). Entre outras funções, a JM atua na exclusão de diversas proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira, dando início à formação da membrana do vacúolo parasitóforo (Mordue *et al.*, 1999a; Charron e Sibley, 2004) (Esquema 6)



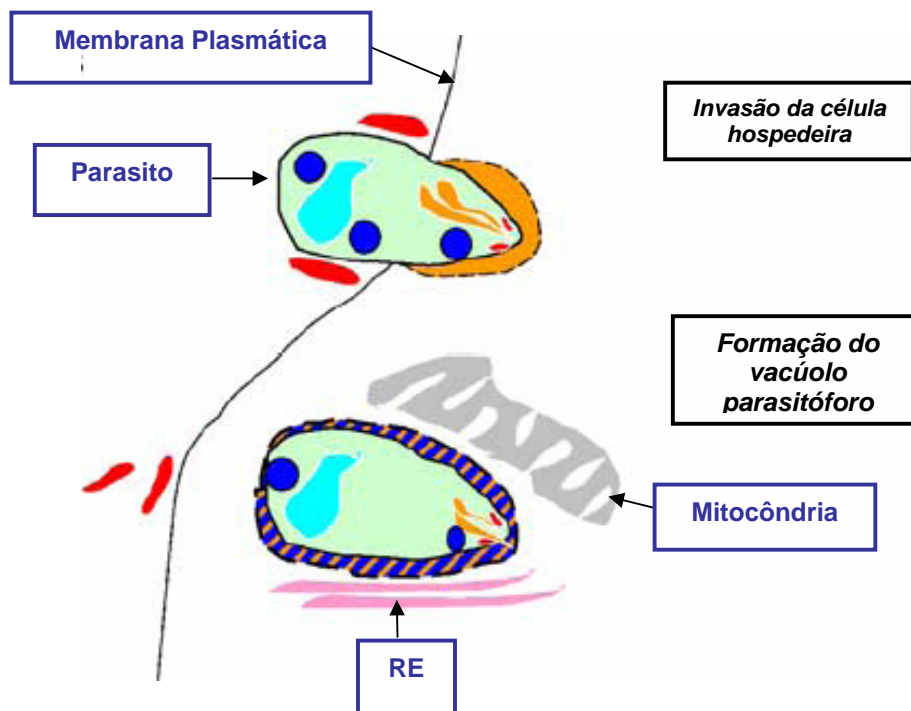
Esquema 6: Etapas do processo de invasão da célula hospedeira por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. (Adaptado de Carruthers e Boothroyd, 2007).

2.2. FORMAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO

Após a invasão da célula hospedeira, o *T. gondii* é encontrado no interior de um compartimento revestido por membrana denominado vacúolo parasitóforo (VP), onde se multiplica. Embora, ocasionalmente, o parasito também possa ser encontrado no interior do núcleo da célula, sem estar envolvido por um vacúolo, como foi recentemente demonstrado (Barbosa *et al.*, 2005).

O VP fornece ao *T. gondii* um ambiente altamente protegido e especializado para seu crescimento e desenvolvimento, uma vez que não se acidifica e não se funde com compartimentos da via endocítica da célula hospedeira (Jones *et al.*, 1972; Sibley *et al.*, 1985; Carvalho e de Souza, 1990; Joiner *et al.*, 1990; Mordue *et al.*, 1999b; Cortez *et al.*, 2005). Componentes de superfície da célula hospedeira, que são necessários para a fusão das membranas, como por exemplo LAMP1, são excluídos do VP durante a invasão do parasito (Carvalho e de Souza, 1989; Joiner *et al.*, 1990; Mordue e Sibley, 1997; Pacheco-Soares e De Souza, 1998; Mordue *et al.*, 1999b; de Souza, 2005). O estudo da formação do VP e sua interação com a célula hospedeira são de grande interesse, considerando que esse é o ponto crucial para o sucesso do parasitismo intracelular (Joiner, 1991; Ward *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1994; Suss-Toby *et al.*, 1996; Silverman e Joiner, 1997; Black e Boothroyd, 2000; Carruthers, 2002; Martin *et al.*, 2007).

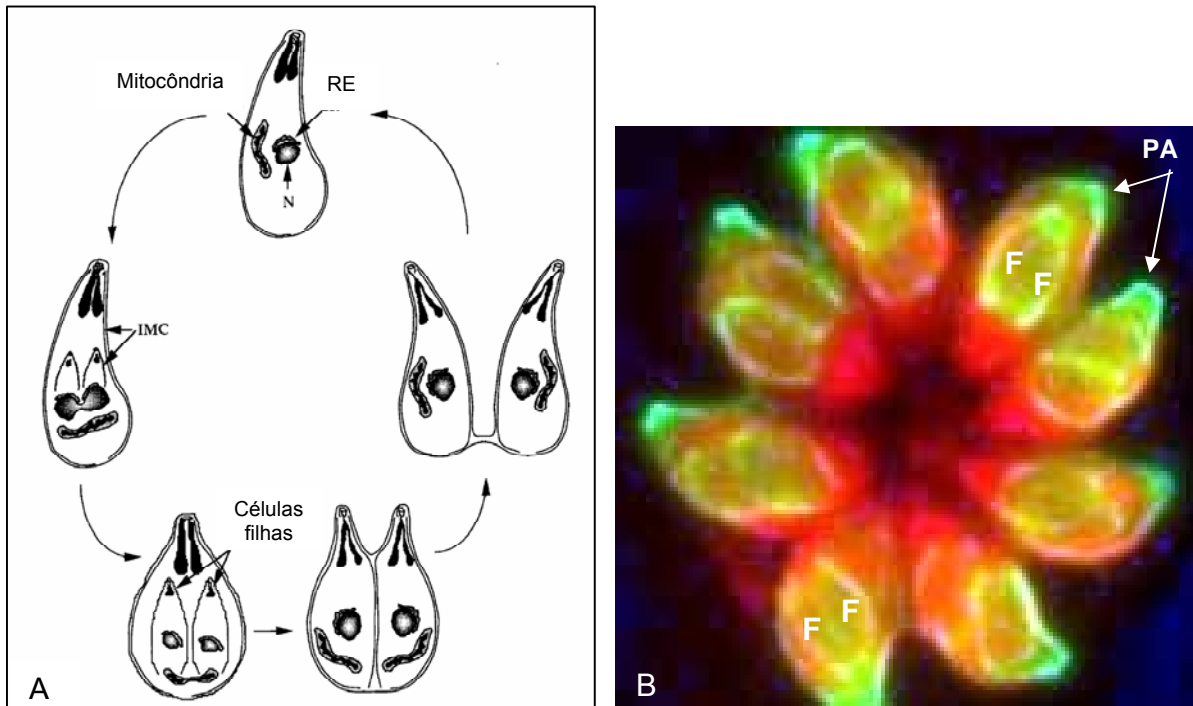
A membrana do VP (MVP) é uma estrutura dinâmica formada a partir da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira. As proteínas das róprias e grânulos densos participam da modificação dessa membrana, estabelecendo uma membrana híbrida, contribuindo para a sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira (Nichols *et al.*, 1983; Carvalho e de Souza, 1989, 1990; Carvalho *et al.*, 1993; Carvalho e De Souza, 1997; Sinai e Joiner, 1997; Pacheco-Soares e De Souza, 1998; Hakansson *et al.*, 2001; de Souza, 2005) (Esquema 7)



Esquema 7: As proteínas dos micronemas (vermelho) não são detectadas no VP nascente, enquanto que proteínas das rôptrias (coral), como ROP1, participam da formação do VP. Após a invasão com sucesso, os parasitos são encontrados no VP que se associa à mitocôndria (cinza) e ao RE (rosa) da célula hospedeira. A secreção dos grânulos densos (azul) ocorre após a completa invasão do parasito, contribuindo para a modificação da MVP. (Adaptado de Kim, 2004).

2.3. MULTIPLICAÇÃO DO *T. gondii* NO VACÚOLO PARASITÓFORO

Uma vez no interior do VP, o *T. gondii* se multiplica por um processo denominado endodiogenia, no qual duas células filhas são geradas dentro da célula mãe (Black e Boothroyd, 2000; Hu *et al.*, 2002) (Esquema 8). O processo de replicação ocorre sincronicamente, de modo que os parasitos são vistos sempre em grupos de dois (Carruthers, 2002). Após 24h de infecção, este processo de proliferação forma uma estrutura típica no interior do VP, denominada roseta, facilmente identificada ao microscópio de luz, onde os parasitos apresentam o pólo apical apontando para fora do centro (Black e Boothroyd, 2000) (Esquema 8).



Esquema 8: (A) Diagrama da endodiogenia (adaptado de Black e Boothroyd, 2000). (B) Imunofluorescência mostrando uma roseta em detalhe. PA. - Pólo apical do parasito evidenciando o conóide marcado em verde. F - Células filhas no interior de um taquizoíto mãe, indicando a multiplicação. (Fonte: outlook.wustl.edu/winter2001/microbiology.html)

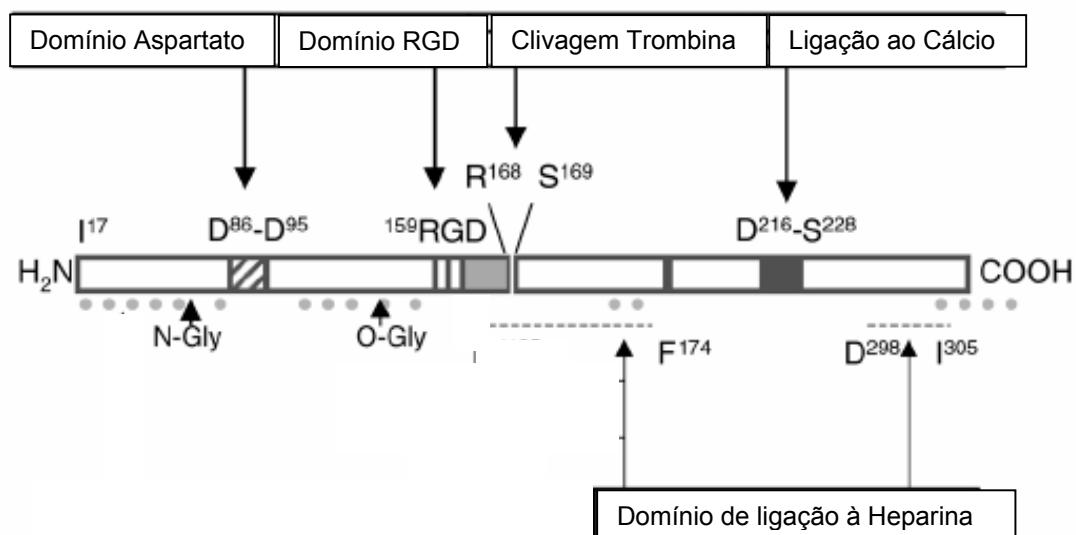
2.4. EGRESSO

Uma vez no interior do VP, o parasito se multiplica até a completa destruição da célula hospedeira, quando parte para infectar novas células. *In vitro*, o egresso de taquizoítos de *T. gondii* é um evento rápido que ocorre após a multiplicação do parasito no VP (48 – 72h de infecção). Esse processo resulta na lise da célula hospedeira e liberação dos parasitos, os quais podem, imediatamente, invadir as células vizinhas para iniciar um novo ciclo de multiplicação (Black e Boothroyd, 2000; Lavine e Arrizabalaga, 2007).

3. Osteopontina

A Osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína adesiva secretada, multifuncional, que foi primeiramente identificada como a principal sialoproteína do osso (Prince e Butler, 1987). Subseqüentemente foi observado a sua expressão por diversos tipos celulares (Murry *et al.*, 1994; Hartner *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). Apesar de ser amplamente conhecida como OPN, ocasionalmente essa proteína também pode ser denominada como uropontina, sialoproteína do osso I (BSPI), 44 KDa fosfoproteína do osso, 2aR, 2B7, eta-1 e fosfoproteína secretada I (SPP) (Oldberg *et al.*, 1986; O'Regan *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2006).

A OPN é uma proteína de 264-301 aminoácidos (dependendo da espécie), que contém regiões altamente conservadas as quais mostram homologia a vários domínios funcionais previamente descritos. Esses domínios incluem uma seqüência sinal, regiões de ligação ao cálcio e à heparina, o domínio RGD de ligação à integrina, e locais de fosforilação de serina (Oldberg *et al.*, 1986; Denhardt *et al.*, 2001) (Esquema 9).



Esquema 9: Algumas características da proteína OPN (adaptado de Denhardt *et al.*, 2001).

A OPN possui um peso molecular predito de 32 kDa, entretanto, ocorrem modificações pós-traducionais, incluindo fosforilações e glicosilações, resultando em uma proteína com mobilidade eletroforética entre 44 e 75 kDa (O'Regan, 2003). A OPN está envolvida em uma variedade de eventos patológicos e fisiológicos, incluindo: sobrevivência, sinalização e adesão celular, inflamação, imunidade mediada por células, reparação tecidual e metástase (Standal *et al.*, 2004; Maeno *et al.*, 2006; Rangaswami *et al.*, 2006).

Embora a OPN já tenha sido descrita em vários tipos celulares apresentando diferentes funções, até o momento nenhum trabalho demonstrou a presença de OPN em protozoários.

Justificativa

Nos últimos anos, o *Toxoplasma gondii* tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa uma vez que é o causador da principal infecção oportunista por protozoários em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e também causador da toxoplasmose congênita.

A proposta do presente projeto foi dar continuidade ao estudo da interação *Toxoplasma gondii* - células hospedeiras, uma vez que a toxoplasmose é considerada uma das zoonoses parasitárias mais comuns e, portanto, de grande importância na saúde pública mundial. O estudo da expressão e participação de osteopontina durante a interação taquizoítos de *Toxoplasma gondii* – células hospedeiras pretendeu avançar na compreensão dos mecanismos de interação do parasito com a célula hospedeira e subsequente formação do vacúolo parasitóforo, etapas essenciais para o sucesso do parasitismo e que ainda necessitam de maiores estudos para serem esclarecidas.

Objetivos

Objetivo geral:

O principal objetivo desse trabalho foi analisar o perfil de expressão de osteopontina por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, bem como sua participação no processo de interação com a célula hospedeira.

Objetivos específicos:

- 1- Analisar o perfil de expressão de osteopontina em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares por microscopia de varredura confocal a laser.
- 2- Localizar ultraestruturalmente a expressão de osteopontina em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares por microscopia eletrônica de transmissão.
- 3- Detectar a expressão de osteopontina em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares por western blotting.
- 4- Detectar a expressão gênica de osteopontina em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares por RT-PCR.
- 5- Analisar a expressão e a participação da osteopontina durante a evolução da infecção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em macrófagos peritoneais por microscopia de varredura confocal a laser.

Materiais e Métodos

1- Obtenção dos parasitos:

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos através de passagens intraperitoneais em fêmeas de camundongos suíços e coletados em tampão fosfato salina (PBS) a pH 7.2, após 72h de infecção. A suspensão obtida foi centrifugada a 1.000 RPM por 10 min para remover completamente as células e debris. O sobrenadante, contendo somente os parasitos, foi coletado e centrifugado a 1.500 RPM por 10 min. O precipitado foi lavado por 2 vezes e ressuspendido em meio DMEM. Os parasitos foram utilizados 30-40 min após a remoção da cavidade peritoneal e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com azul Trypan.

2- Cultivo de macrófagos peritoneais

Macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos suíços após a injeção de PBS pH 7.2 e, então, plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após a incubação por 1h a 37°C, as células não-aderentes foram removidas e meio DMEM acrescido de 10% SFB e antibióticos foi adicionado. Os macrófagos foram cultivados por 24h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e, então, utilizados para os experimentos.

3- Análise da expressão de OPN por microscopia confocal

Taquizoítos de *T. gondii* aderidos sobre lamínulas previamente revestidas com Poly-L-lisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) ou macrófagos infectados com *T. gondii* por 15 min, 30 min, 1h e 24h foram fixados em paraformaldeído a 4% em PBS,

pH 7.2, por 15 min. Em seguida, as células foram permeabilizadas em PBS contendo Triton X-100 0,5% por 15 min e incubadas em cloreto de amônio por 30 min. Após este tempo, as culturas foram lavadas com PBS-BSA 1%, incubadas em PBS-BSA 3% por 30 min e então, incubadas “overnight” com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina obtido em rato (1:100; Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA). Após a incubação com o anticorpo primário, as culturas foram incubadas com PBS-BSA 3% por 20 min, lavadas com PBS-BSA 1% e incubadas por 1h com o anticorpo secundário anti-rato conjugado com FITC (1:100; Sigma). Finalmente, as culturas foram incubadas com PBS-BSA 3% por 20 min, lavadas com PBS-BSA 1%, e em seguida com PBS puro e então, montadas em N-Propil-Galato sobre lâminas e observadas ao microscópio de varredura confocal a laser Olympus CLSM FV 300 Fluoview Version 3.3. Os controles foram realizados pela omissão do anticorpo primário.

4- Localização da expressão de OPN por Imunocitoquímica ultraestrutural

Taquizoítos de *T. gondii* extracelulares foram fixados em solução contendo: paraformaldeído 2%, glutaraldeído 0.2% e ácido pícrico 0,1% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.2 por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, desidratadas em etanol e incluídas em resina LRWhite (Sigma). Para a imunocitoquímica, os cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel, lavados em PBS/BSA e incubados em cloreto de amônio por 30 min. Em seguida, foram incubados “overnight” com o anticorpo monoclonal anti-osteopontina obtido em rato (Chemicon), lavados e incubados com o anticorpo secundário anti-rato conjugado com ouro coloidal (10nm) (Sigma) por 1h. Após a imunocitoquímica, os cortes foram contrastados com acetato de uranila e examinados ao microscópio eletrônico de

transmissão Zeiss 906. Os controles foram realizados pela omissão do anticorpo primário.

5- Análise da expressão de OPN por Western Blotting:

Taquizoítos de *T. gondii* extracelulares foram lavados em PBS, pH 7.2 e lisados em gelo por 1h em solução contendo NP-40 1% em tampão fosfato 50mM (pH 7.4) suplementado com NaCl 0.1M e EDTA 5mM. Os parasitos solubilizados foram centrifugados a 10.000g por 30 min a 4°C para a deposição de debris insolúveis. Fibroblastos esqueléticos de fetos de rato, conhecidos por expressarem OPN, foram utilizados como controle positivo (Pereira *et al.*, 2006). O conteúdo total de proteínas no extrato celular foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, o lisado celular foi desnaturado em solução tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,0001%) e aquecido em banho-maria por 3 min. As amostras (30 µg de proteína total) foram separadas em gel SDS 12% de poliacrilamida e posteriormente transferidas para uma membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech) foram utilizados em paralelo. As membranas foram bloqueadas com Tween-TBS (Tri-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%) contendo 2% de albumina bovina e, então incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-osteopontina obtido em rato (1:1.000; Chemicon) ou com o anticorpo primário policlonal anti-osteopontina obtido em cabra (1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Após a lavagem com Tween-TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-rato ou anti-cabra (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology), respectivamente por 1h e em seguida, incubadas com streptavidina conjugada com peroxidase (1:1.000; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco,

CA, USA). As bandas imunomarcadas foram reveladas com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma).

6- Análise da expressão de RNAm para OPN por RT-PCR

Taquizoítos de *T. gondii* foram isolados como descrito acima. Em seguida, o RNA total foi extraído utilizando-se Reagente TRIzol, conforme instruções do fabricante (Invitrogen) e quantificado por absorvância em 260nm. Após o tratamento com DNase (RQ1 RNase-Free DNase; Promega, São Paulo, SP, Brasil), o RNA total extraído (2,0µg) foi reversamente transcrito em cDNA a 42°C, na presença da enzima transcriptase reversa (MMLV Promega) e de oligo dT (Promega) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os genes foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se GoTaq DNA polimerase (Promega) e *primers* específicos usando o sistema de PCR GeneAmp 2400 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). As seqüências dos primers (Dialab Diagnostics, MG, Brasil) foram: OPN de murino (GI 21435805): 5'-TGTGTCCTCTGAAGAAAAGGATGAC-3' (Senso); 5'- TCTGTGGCATCAGGATACTGTTCA-3' (Antisenso) e Beta Tubulina de *Toxoplasma gondii* (TUB2 – GI 161938), usada como um controle interno: 5'-ATGCAGGCGCGGCGACATCG-3' (Senso) e 5'- CGGACCCGCGCGAACGCTGTCC -3' (Antisenso). Os pesos moleculares preditos para os fragmentos eram 335bp para OPN e 129bp para TUB2. Os protocolos da PCR foram como se segue: início 95°C, 27 ciclos a 95°C para 60s, 54°C para 60s, e 72°C para 26s. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1.5% contendo brometo de etídeo e, então, visualizados com luz UV. A análise foi realizada pela mensuração das intensidades das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados através do software Photoshop (Adobe

Systems, Mountain View, CA). Os valores correspondentes ao RNAm de OPN foram medidos em relação aos níveis de mRNA do gene controle Beta Tubulina.

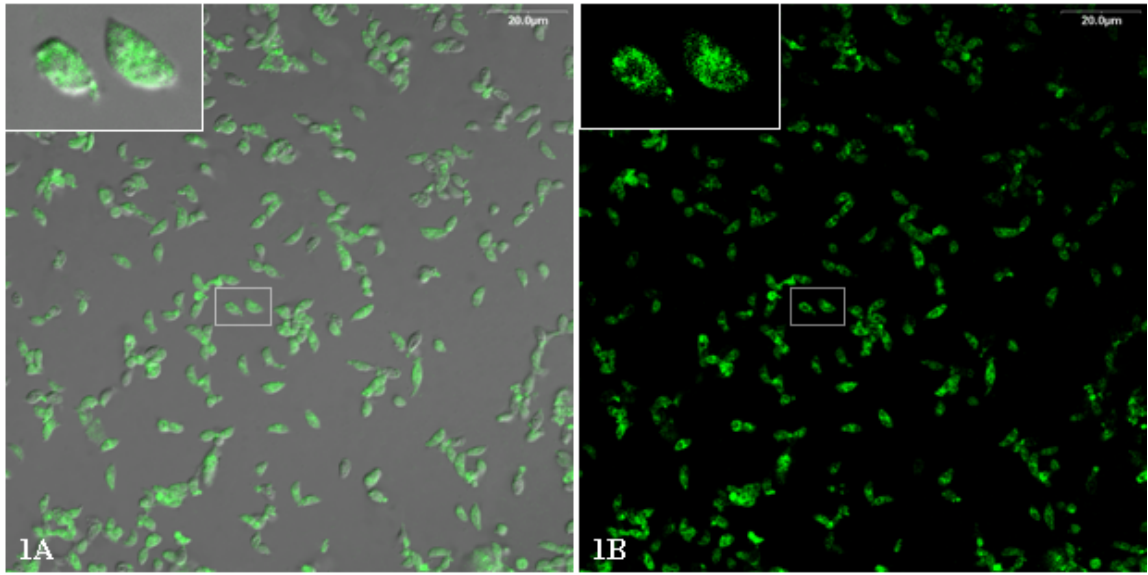
Resultados

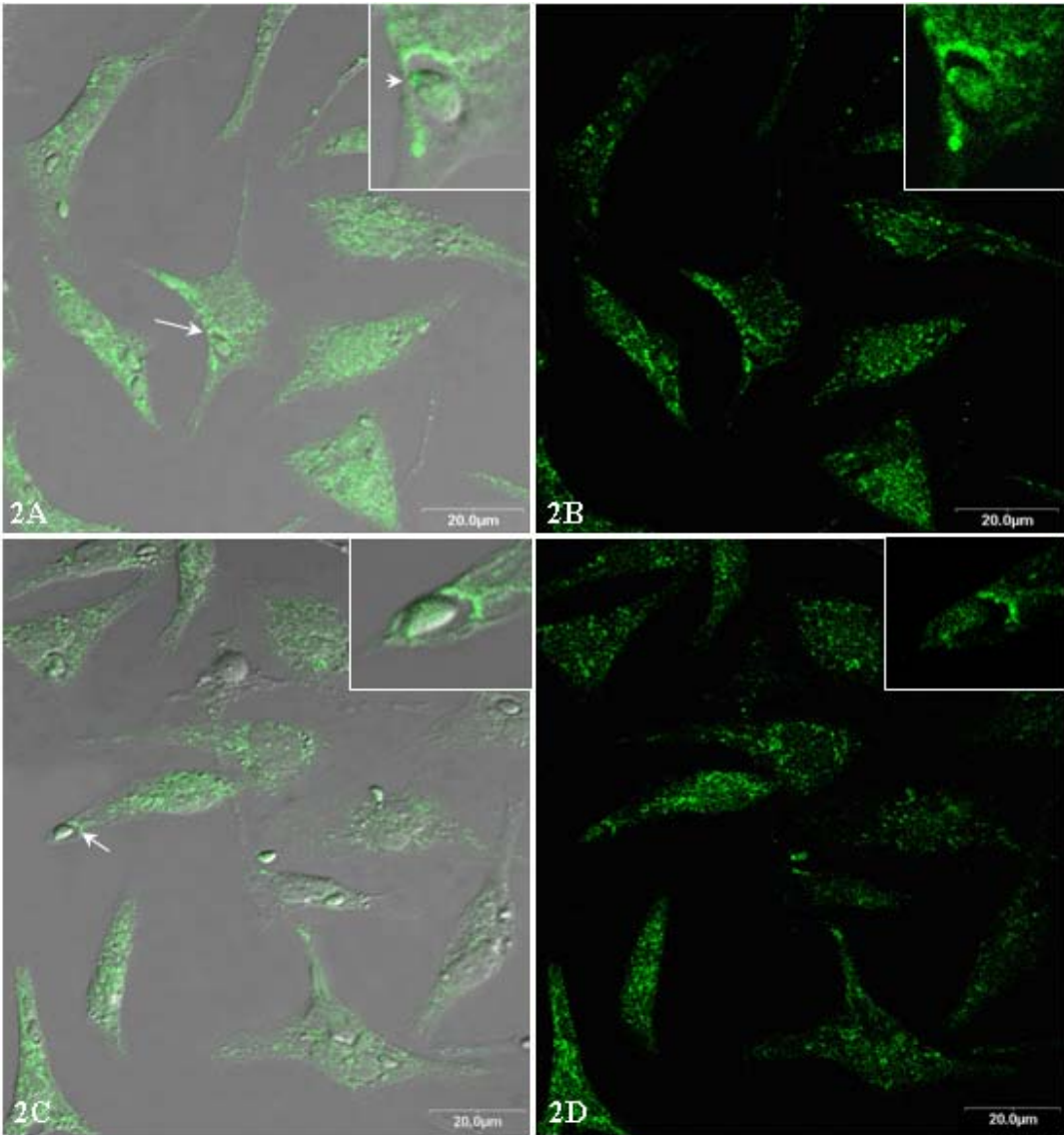
Análise da expressão de OPN por microscopia confocal

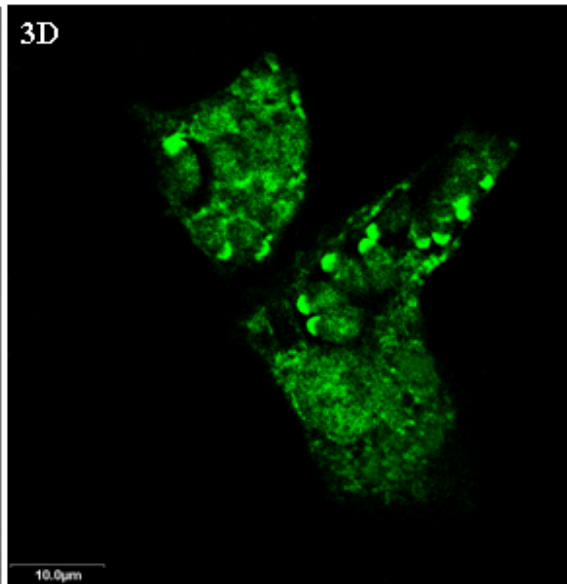
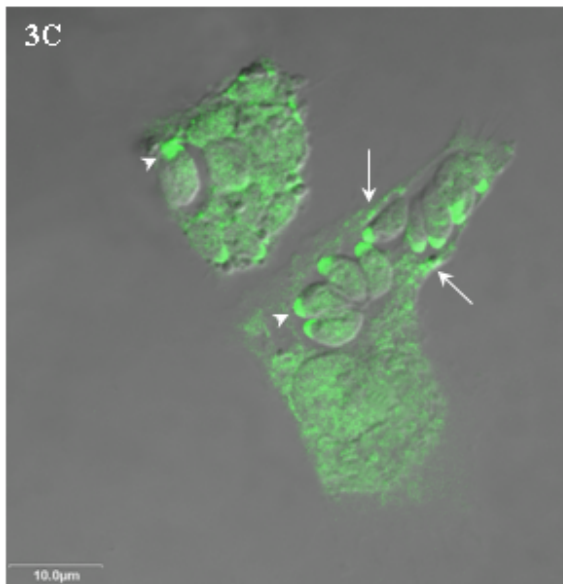
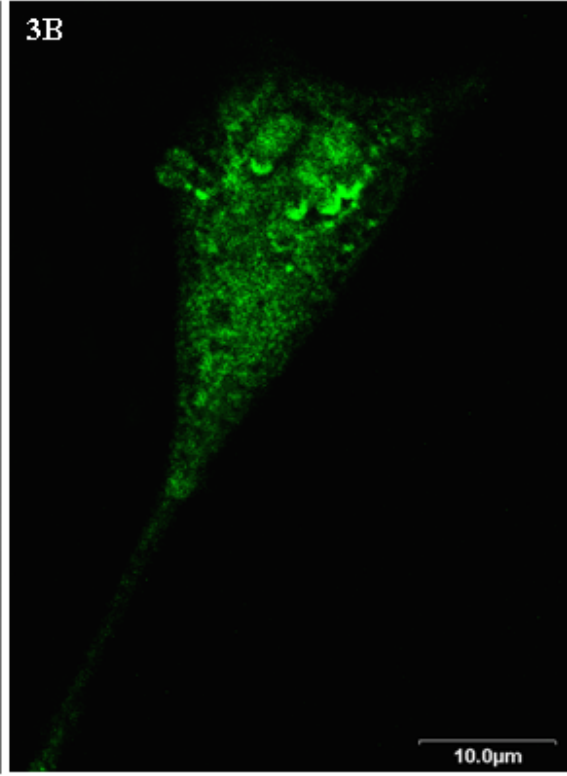
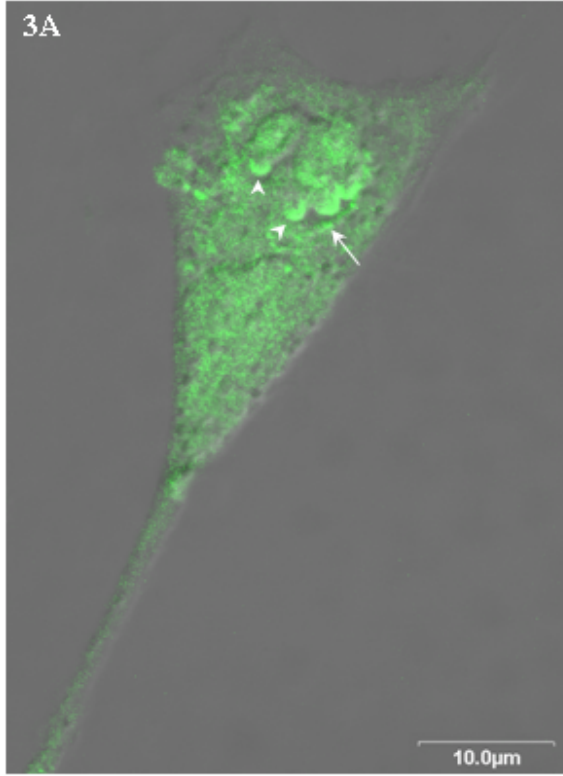
A microscopia confocal mostrou uma intensa marcação positiva para uma proteína OPN-like como pequenos pontos dispersos pelo citoplasma de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares, um padrão típico de grânulos densos (Fig. 1). Durante a primeira hora seguindo a invasão dos macrófagos, foi observado a marcação positiva para a proteína na membrana de alguns vacúolos parasitóforos e também na porção sub-apical de alguns parasitos (Fig. 2). Após 24h de infecção, a marcação positiva sub-apical para a proteína OPN-like estava intensa nos parasitos intravacuolares e também permanecia localizada na membrana do vacúolo parasitóforo (Fig. 3). Os controles realizados na ausência do anticorpo primário não apresentaram marcação, confirmando a especificidade da reação (dados não mostrados).

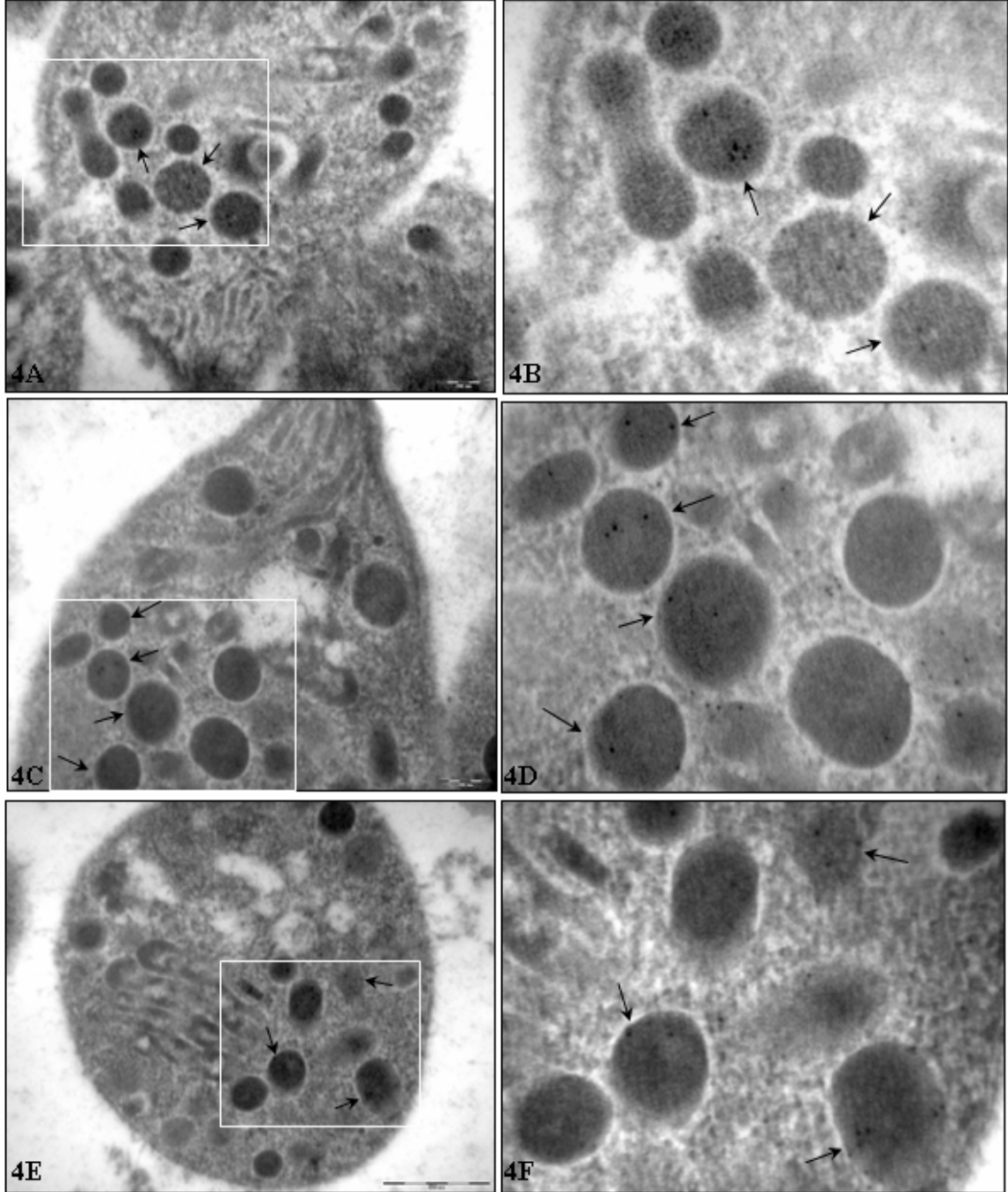
Localização da expressão de OPN por Imunocitoquímica ultraestrutural

A incubação dos cortes ultrafinos de taquizoítos de *T. gondii* extracelulares incluídos em LRWhite com o anticorpo monoclonal anti-osteopontina confirmou a localização da proteína OPN-like nos grânulos densos (Fig. 4). Nenhuma marcação foi observada em róptrias ou micronemas. Os controles foram realizados na ausência do anticorpo primário e não apresentaram nenhuma marcação, confirmando a especificidade da reação (dados não mostrados).









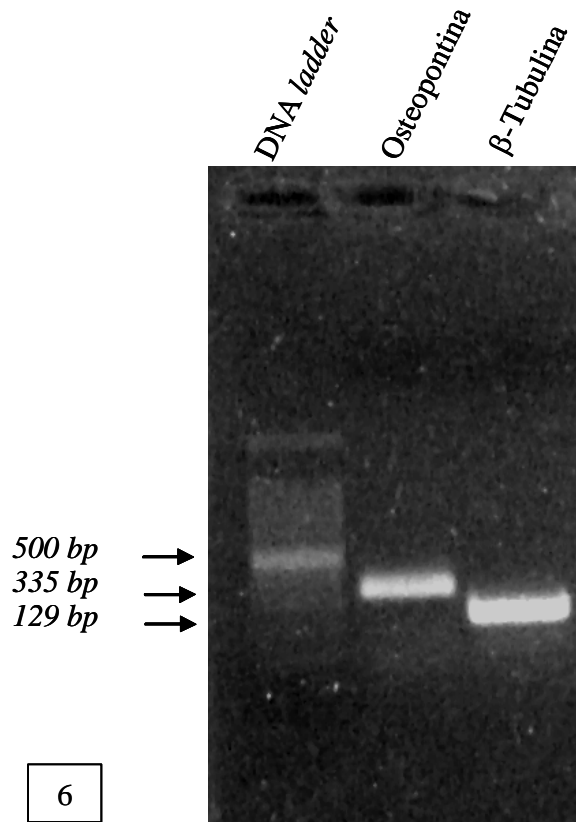
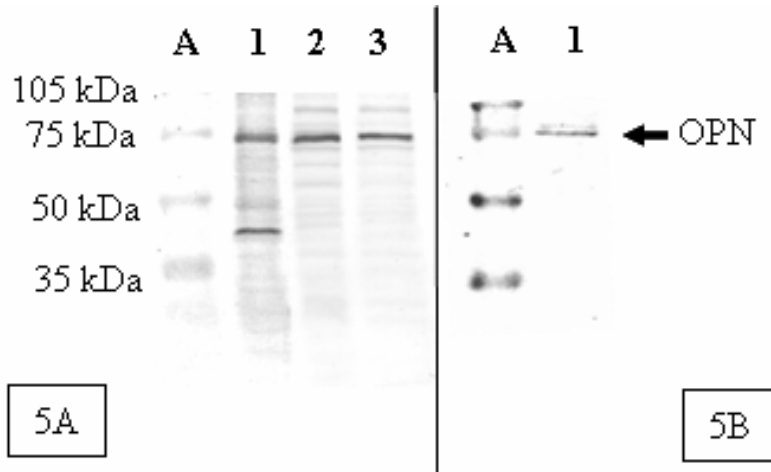
Resultados

Análise da expressão de OPN por western blotting

O western blotting foi realizado utilizando os anticorpos anti-osteopontina monoclonal e policlonal de fabricantes diferentes, os quais revelaram a mesma banda de proteína. Os resultados confirmaram os dados da imunofluorescência e da imunocitoquímica ultraestrutural de que uma proteína OPN-like é expressa em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares (Fig. 5).

Análise da expressão de RNAm para OPN por RT-PCR

Para determinar a expressão gênica da proteína OPN-like, o RNAm de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares purificados foi determinado por RT-PCR. O *Toxoplasma gondii* apresentou a expressão de RNAm dessa proteína, confirmando que esses parasito expressam uma proteína OPN-like (Fig. 6).



Discussão

A análise por microscopia confocal demonstrou uma intensa marcação para uma proteína OPN-like como pequenos pontos no interior de taquizoítos de *T. gondii*, uma característica típica de proteínas de GDs. A prova definitiva foi obtida através da imunocitoquímica ultraestrutural realizada em parasitos extracelulares com o anticorpo monoclonal anti-OPN, confirmando a localização de uma proteína OPN-like nos GDs. A expressão dessa proteína em taquizoítos extracelulares foi também confirmada por western blotting, que revelou um banda de proteína com peso molecular consistente à mobilidade eletroforética descrita para a OPN, e por RT-PCR, que mostrou a presença de RNAm para uma proteína OPN-like.

Nós pesquisamos a data base dbEST e a seqüência genômica do *T. gondii* buscando a presença de gene(s) homólogo(s) à OPN, mas não encontramos nenhum gene com alta homologia. Entretanto, a seqüência genômica do *T. gondii* ainda não está completa, logo, nós não podemos confirmar se essa proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal é a OPN expressa por uma variedade de células eucarióticas ou se é uma proteína homóloga. Dessa forma, nós sugerimos que seja uma proteína OPN-like.

A liberação das proteínas de GDs ocorre de forma constitutiva durante o desenvolvimento intravacuolar do parasito ou por uma explosão de secreção, o qual ocorre especificamente logo após a formação do VP (Carruthers e Sibley, 1997). Seguindo a secreção dos GDs a partir do pólo anterior do parasito, a maioria das proteínas GRAs aparece tanto na forma solúvel quanto associada à membrana no vacúolo. Dentro desse compartimento, elas se associam especificamente com a MVP

ou com a rede intravacuolar (Mercier *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006). Nossos resultados mostrando uma intensa marcação para a proteína OPN-like no pólo anterior do parasito e sua localização na MVP após a invasão dos macrófagos, reforça a idéia proposta nesse trabalho de que essa proteína deva ser expressa e secretada por taquizoítos de *T. gondii*, especificamente pelos GDs.

Embora as funções das proteínas de GDs ainda não estejam completamente compreendidas, no *T. gondii*, a sua explosão de secreção no VP durante a primeira hora seguindo a invasão da célula hospedeira e seu alvo seletivo, contribuem largamente para a construção desse novo compartimento e teriam importantes funções no metabolismo do vacúolo (Carruthers e Sibley, 1997; Mercier *et al.*, 2005). Nós demonstramos nesse trabalho que taquizoítos de *T. gondii* expressam uma proteína OPN-like em GDs e que essa proteína é encontrada em associação com a MVP após a invasão da célula hospedeira, de acordo com as características descritas acima para as proteínas de GDs. Portanto, nós podemos especular que essa proteína OPN-like, associada às proteínas GRAs, participa durante o processo de interação do parasito com a célula hospedeira e da formação do VP, contribuindo para o sucesso do parasitismo intracelular do *T. gondii*.

Uma vez que a proteína OPN-like foi detectada nos GDs, organelas presentes no filo Apicomplexa, essa proteína poderia servir como um possível alvo terapêutico. Nesse sentido, a produção de taquizoítos de *T. gondii* nulos para a proteína OPN-like seria de grande importância para responder às questões relacionadas às funções dessa proteína durante a interação do parasito com a célula hospedeira.

Conclusões

Com base em nossos resultados, nós podemos concluir que:

- (1)** Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extracelulares expressam uma proteína osteopontina-like no interior dos grânulos densos.

- (2)** A localização sub-apical da proteína osteopontina-like em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* intravacuolares confirma que seja uma proteína de grânulo denso, já que esse é o local onde ocorre a sua exocitose.

- (3)** Essa proteína osteopontina-like é secretada por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* no interior do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a composição da membrana desse vacúolo.

Referências bibliográficas

- ADJOGLE KD, MERCIER C, DUBREMETZ JF, HUCKE C, MACKENZIE CR, CESBRON-DELAUW MF, DAUBENER W: GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *International Journal for Parasitology* 2004; **34**: 1255-1264.
- AHN HJ, KIM S, NAM HW: Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; **331**: 614-620.
- AHN HJ, KIM S, KIM HE, NAM HW: Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean Journal of Parasitology* 2006; **44**: 303-312.
- ALEXANDER DL, MITAL J, WARD GE, BRADLEY P, BOOTHROYD JC: Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS pathogens* 2005; **1**: e17.
- BANERJEE A, BURGHARDT RC, JOHNSON GA, WHITE FJ, RAMAIAH SK. The temporal expression of osteopontin (SPP-1) in the rodent model of alcoholic steatohepatitis: a potential biomarker. *Toxicologic Pathology* 2006; **34**: 373-384.
- BARBOSA, H. S., FERREIRA-SILVA, M. F., GUIMARAES, E. V., CARVALHO, L. & RODRIGUES, R. M. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *The Journal of Parasitology* 2005; **91**: 182-184.
- BARRAGAN A, BROSSIER F, SIBLEY LD: Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cellular Microbiology* 2005; **7**: 561-568.

- BLACK MW, BOOTHROYD JC: Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; **64**: 607-623.
- BLACKMAN MJ, BANNISTER LH: Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2001; **117**: 11-25.
- BONFIOLI AA, OREFICE F: Toxoplasmosis. *Seminars in Ophthalmology* 2005; **20**: 129-141.
- BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; **72**: 248-254.
- BROSSIER F, SIBLEY LD: *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005; **37**: 2266-2272.
- BUCKLEY SM: Survival of *Toxoplasma gondii* in mosquito cell lines and establishment of continuous infection in Vero cell cultures. *Experimental Parasitology* 1973; **33**: 23-26.
- CARRUTHERS VB: Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica* 2002; **81**: 111-122.
- CARRUTHERS VB, BOOTHROYD JC: Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion on Microbiology* 2007; **10**: 83-89.
- CARRUTHERS VB, SIBLEY LD: Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* 1997; **73**: 114-123.
- CARVALHO L, DE SOUZA W: Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *The Journal of Protozoology* 1989; **36**: 164-170.

- CARVALHO L, DE SOUZA W: Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. *European Journal of Cell Biology* 1990; **51**: 211-219.
- CARVALHO L, DE SOUZA W: Carbohydrate-containing molecules found in rhoptries are released during active penetration of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in host cells. *Biocell* 1997; **21**: 27-31.
- CARVALHO L, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W: Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology* 1991; **77**: 156-161.
- CARVALHO L, YAN CY, DE SOUZA W: Effect of various digestive enzymes on the interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. *Parasitology Research* 1993; **79**: 114-118.
- CESBRON-DELAUW MF, LECORDIER L, MERCIER C: Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1996; **219**: 59-65.
- CHARRON AJ, SIBLEY LD: Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 2004; **5**: 855-867.
- CINTRA WM, DE SOUZA W: Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii*. *European Journal of Cell Biology* 1985; **37**: 63-69.
- CORTEZ E, STUMBO AC, DE CARVALHO TM, BARBOSA HS, CARVALHO L: NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. *The Journal of Parasitology* 2005; **91**: 1052-1057.

- DE SOUZA W: Fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1974; **16**: 32-38.
- DE SOUZA W: Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochemistry and Cell Biology* 2005; **123**: 1-18.
- DE SOUZA WACES, N. L.: Cell fractionation of parasitic protozoa: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2003; **98**: 151-170.
- DENHARDT DT, NODA M, O'REGAN AW, PAVLIN D, BERMAN JS: Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; **107**: 1055-1061.
- DUBEY JP: Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1986; **189**: 166-170.
- DUBEY JP: Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; **205**: 1593-1598.
- DUBEY JP: Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 1997; **44**: 592-602.
- DUBEY JP: Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *The Journal of Parasitology* 2002; **88**: 713-717.
- DUBEY JP: Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology* 2004; **126**: 57-72.
- DUBEY JP, BEATTIE CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton 1988.
- DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA: Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; **11**: 267-299.

- DUBEY JP, LUNNEY JK, SHEN SK, KWOK OC, ASHFORD DA, THULLIEZ P: Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *The Journal of Parasitology* 1996; **82**: 438-443.
- EL HAJJ H, LEBRUN M, FOURMAUX MN, VIAL H, DUBREMETZ JF: Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cellular Microbiology* 2006; **9**: 54-64.
- FICHERA ME, ROOS DS: A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 1997; **390**: 407-409.
- GRIMWOOD J, SMITH JE: *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *International Journal for Parasitology* 1996; **26**: 169-173.
- GUIMARAES EV, ACQUARONE M, DE CARVALHO L, BARBOSA HS: Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization. *Micron* 2007; **38**: 651-658.
- HAKANSSON S, CHARRON AJ, SIBLEY LD: *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The Embo Journal* 2001; **20**: 3132-3144.
- HARTNER A, PORST M, GAUER S, PROLS F, VEELKEN R, HILGERS KF: Glomerular osteopontin expression and macrophage infiltration in glomerulosclerosis of DOCA-salt rats. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; **38**: 153-164.
- HEINTZELMAN MB: Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. *International Review of Cytology* 2006; **251**: 79-129.
- HENRIQUEZ FL, NICKDEL MB, MCLEOD R, LYONS RE, LYONS K, DUBREMETZ JF, GRIGG ME, SAMUEL BU, ROBERTS CW: *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is

- a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitology* 2005; **131**: 169-179.
- HILL DE, CHIRUKANDOTH S, DUBEY JP: Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews* 2005; **6**: 41-61.
- HU K, JOHNSON J, FLORENS L, FRAUNHOLZ M, SURAVAJJALA S, DiLULLO C, YATES J, ROOS DS, MURRAY JM: Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens* 2006; **2**: e13.
- HU K, MANN T, STRIEPEN B, BECKERS CJ, ROOS DS, MURRAY JM: Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 593-606.
- JOINER KA: Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: A slippery issue. *Parasitology Today* 1991; **7**: 226-227.
- JOINER KA, FUHRMAN SA, MIETTINEN HM, KASPER LH, MELLMAN I: *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 1990; **249**: 641-646.
- JOINER KA, ROOS DS: Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *The Journal of Cell Biology* 2002; **157**: 557-563.
- JONES TC, YEH S, HIRSCH JG: The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *The Journal of Experimental Medicine* 1972; **136**: 1157-1172.
- KIM K: Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Tropica* 2004; **91**: 69-81.
- KIM K, WEISS LM: *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International Journal for Parasitology* 2004; **34**: 423-432.

- KOHLER S, DELWICHE CF, DENNY PW, TILNEY LG, WEBSTER P, WILSON RJ, PALMER JD, ROOS DS: A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 1997; **275**: 1485-1489.
- LAVINE MD, ARRIZABALAGA G: Invasion and egress by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*: potential targets for the development of new antiparasitic drugs. *Current Pharmaceutical Design* 2007; **13**: 641-651.
- LI G, OPARIL S, KELPKE SS, CHEN YF, THOMPSON JA: Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation* 2002; **106**: 854-859.
- LIENDO A, STEDMAN TT, NGO HM, CHATURVEDI S, HOPPE HC, JOINER KA: *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 18272-18281.
- MAENO Y, NAKAZAWA S, DAO LD, TUAN NV, GIANG ND, HANH TV, TANIGUCHI K. Osteopontin is involved in Th1-mediated immunity against *Plasmodium falciparum* infection in a holoendemic malaria region in Vietnam. *Acta Tropica* 2006; **98**: 305-310.
- MARTIN AM, LIU T, LYNN BC, SINAI AP: The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 2007; **54**: 25-28.
- MERCIER C, ADJOGLE KD, DAUBENER W, DELAUW MF: Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International Journal for Parasitology* 2005; **35**: 829-849.
- MORDUE DG, DESAI N, DUSTIN M, SIBLEY LD: Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins

- on the basis of their membrane anchoring. *The Journal of Experimental Medicine* 1999a; **190**: 1783-1792.
- MORDUE DG, HAKANSSON S, NIESMAN I, SIBLEY LD: *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental Parasitology* 1999b; **92**: 87-99.
- MORDUE DG, SIBLEY LD: Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *Journal of Immunology* 1997; **159**: 4452-4459.
- MORISAKI JH, HEUSER JE, SIBLEY LD: Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science* 1995; **108 (Pt 6)**: 2457-2464.
- MORRISSETTE NS, SIBLEY LD: Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science* 2002; **115**: 1017-1025.
- MURRY CE, GIACHELLI CM, SCHWARTZ SM, VRACKO R: Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *The American Journal of Pathology* 1994; **145**: 1450-1462.
- NGO HM, HOPPE HC, JOINER KA: Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends in Cell Biology* 2000; **10**: 67-72.
- NICHOLS BA, CHIAPPINO ML: Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Protozoology* 1987; **34**: 217-226.
- NICHOLS BA, CHIAPPINO ML, O'CONNOR GR: Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *Journal of Ultrastructure Research* 1983; **83**: 85-98.
- NICHOLS BA, O'CONNOR GR: Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Laboratory Investigation* 1981; **44**: 324-335.

- NICOLLE C, MANCEAUX L: Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondii. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 1908; **147**: 763-766.
- OLDBERG A, FRANZEN A, HEINEGARD D: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; **83**: 8819-8823.
- O'REGAN A, NAU GJ, CHUPP GL, BERMAN JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunology Today* 2000; **21**: 1905-1907.
- O'REGAN A: The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003; **14**: 479-488.
- PACHECO-SOARES C, DE SOUZA W: Redistribution of parasite and host cell membrane components during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Structure and Function* 1998; **23**: 159-168.
- PEREIRA RO, CARVALHO SN, STUMBO AC, RODRIGUES CA, PORTO LC, MOURA AS, CARVALHO L: Osteopontin expression in coculture of differentiating rat fetal skeletal fibroblasts and myoblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 2006; **42**: 4-7.
- PRINCE CW, BUTLER WT: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Collagen and Related Research* 1987; **7**: 305-313.
- RANGASWAMI H, BULBULE A, KUNDU GC: Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends in Cell Biology* 2006; **16**: 79-87.

- REMINGTON JS, MCLEOD R, THULLIEZ P. Toxoplasmosis. In: Infectious diseases of the Fetus and Newborn Infant (Saunders, E, ed). Philadelphia, 2001: 205-346.
- SEEBER F: Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders* 2003; **3**: 99-109.
- SIBLEY LD: Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 2004; **304**: 248-253.
- SIBLEY LD, WEIDNER E, KRAHENBUHL JL: Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 1985; **315**: 416-419.
- SILVERMAN JA, JOINER KA. *Toxoplasma*/host cell interactions. In: Host response to intracellular pathogens. Austin: R. G. Landes, 1997: 313-338.
- SINAI AP, JOINER KA: Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annual Review of Microbiology* 1997; **51**: 415-462.
- SPLENDRE A: Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'unamallatia che ricorda in molti punti il kala azar dell'úomo. *Ver Soc Sci* 1908; **3**: 109-112.
- STANDAL T, BORSET M, SUNDAN A: Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental Oncology* 2004; **26**: 179-184.
- STUMBO AC, BARBOSA HS, CARVALHO TM, PORTO LC, CARVALHO L: Anionic sites, fucose residues and class I human leukocyte antigen fate during interaction of *Toxoplasma gondii* with endothelial cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002; **97**: 517-522.
- SUSS-TOBY E, ZIMMERBERG J, WARD GE: *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; **93**: 8413-8418.

- TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000; **30**: 1217-1258.
- THOMSEN-ZIEGER N, SCHACHTNER J, SEEBER F: Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid. *FEBS Letters* 2003; **547**: 80-86.
- VIVIER E, PETIPREZ A: Le complexe membranaire superficial et son evolution lors de l'elaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology* 1968; **43**: 329-342.
- WARD GE, FUJIOKA H, AIKAWA M, MILLER LH: Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Experimental Parasitology* 1994; **79**: 480-487.
- WARD GE, MILLER LH, DVORAK JA: The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes. *J of Cell Science* 1993; **106 (Pt 1)**: 237-248.
- WERK R: How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Reviews of Infectious Diseases* 1985; **7**: 449-457.
- ZINECKER CF, STRIEPEN B, TOMAVO S, DUBREMETZ JF, SCHWARZ RT: The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998; **97**: 241-246.

ARTIGO ANEXADO



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Micron xxx (2007) xxx-xxx

micron

www.elsevier.com/locate/micron

Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole

Erika Cortez^a, Ana Carolina Stumbo^a, Roberta Saldanha-Gama^b, Christina Gaspar Villela^b,
Christina Barja-Fidalgo^b, Carlos Alberto Rodrigues^c, Maria das Graças Henriques^c,
Marlene Benchimol^d, Helene S. Barbosa^e, Luis Cristóvão Porto^a, Laís Carvalho^{a,*}

^aLaboratório Cultura de Células, Departamento de Histologia e Embriologia, IB, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 3° andar, 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bDepartamento de Farmacologia, IB, UERJ, RJ, Brazil

^cLaboratório de Farmacologia Aplicada, Fiocruz, RJ, Brazil

^dLaboratório de Ultra-estrutura Celular, USU, RJ, Brazil

^eLaboratório de Biologia Estrutural, IOC, Fiocruz, RJ, Brazil

Received 16 July 2007; received in revised form 20 August 2007; accepted 30 August 2007

Abstract

Toxoplasma gondii is an apicomplexan parasite infecting a broad host range, including humans. The parasite invades host cell by active penetration with the participation of its secretory organelles proteins during this process. Until now, only a limited number of secretory proteins have been discovered, and the effectors molecules involved in parasite invasion and survival are not well understood. Osteopontin (OPN) is a multifunctional glycoposphoprotein, secreted by different cell types, which is involved in various physiological and pathological events including cell signaling and survival. For the first time we demonstrated in this work by immunofluorescence and immunoelectron microscopy approaches the localization of an OPN-like protein in dense granules of extracellular *T. gondii* tachyzoites. Western blotting and RT-PCR confirmed this protein expression by the parasites. Our results also showed, after macrophage invasion, an intense positive labeling for OPN-like protein at the sub-apical portion of tachyzoites, the site of dense granules secretion, and the localization of this protein at the parasitophorous vacuole membrane. These data suggest that dense granules secrete an OPN-like protein, and we speculate that this protein participates during the parasite interaction process with host cells and parasitophorous vacuole formation.

© 2007 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Tachyzoites; Dense granules; Osteopontin; Host cell; Macrophage

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular pathogen infecting a variety of host cells where it multiplies within a specially modified compartment called parasitophorous vacuole (PV) (de Souza, 2005; Lemgruber et al., in press; Martin et al., 2007). Inside PV, *T. gondii* stays free from many of the host's immune insults that are encountered by extracellular microbes. This feature crucially relies upon successful entry into a target cell and avoidance of host cell

defenses response such as acidification or endolysosomal hydrolases (Cortez et al., 2005; Carruthers and Boothroyd, 2007).

T. gondii tachyzoites invade host cell by active penetration, a carefully coordinated process driven by the parasite actin and myosin machinery and independent of host cell (Black and Boothroyd, 2000; Kim, 2004). The process begins with gliding motility that utilizes a reversible attachment to migrate over the surface of the host cell, perhaps to find a susceptible site for entry (Heintzelman, 2006). The parasite then establishes an intimate association, involving reorientation to put the apical secretory structures in contact with the host membrane. Next, the specialized secretory organelles: micronemes, rhoptries and dense granules, in the parasite apical end are secreted in a

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25876125.
E-mail address: ldc29@globocom (L. Carvalho).

precisely orchestrated series of events during invasion (Cesbron-Delauw et al., 1996; Carruthers and Sibley, 1997; Brossier and Sibley, 2005; Henriquez et al., 2005; Dubremetz, 2007).

Dense granules (DG) are microspheres of approximately 200 nm in diameter, surrounded by a unique membrane, found in the invasive stages of Apicomplexa. Secretion of DG occurs at a sub-apical location of the parasite by fusion of the DG membrane with the parasite plasma membrane (Mercier et al., 2005). The existence of two mechanisms driving secretion from DG is hypothesized. The first mechanism is a constitutive release (Liendo et al., 2001) and the second mechanism, occurring during the first hour following host cell invasion and regulated by an uncharacterized mechanism (Mercier et al., 2005). The DG proteins (GRA) are a group of relatively small proteins (21–41 kDa). An interesting common feature of GRA proteins is the difference observed between their theoretical molecular weight, calculated from the amino acid sequence and the molecular weight of the native protein, estimated by SDS-PAGE analysis of tachyzoite lysates. This suggests potential post-translational modifications such as phosphorylation and glycosylation (Zinecker et al., 1998; Mercier et al., 2005).

Osteopontin (OPN) is a multifunctional protein that was first identified as a major sialoprotein in bone (Prince and Butler, 1987) and subsequently found to be expressed by several cell types, including macrophages, fibroblasts and myofibroblasts (Murry et al., 1994; Hartner et al., 2001; Li et al., 2002; Pereira et al., 2006). OPN is a secreted adhesive glycoprophosphoprotein that contains 314 amino acids with a predicted molecular mass of 32 kDa (Oldberg et al., 1986; Denhardt et al., 2001). However, like GRA proteins, there are substantial post-translational modifications, including phosphorylation and glycosylation resulting in a protein with electrophoretic mobility between 44 and 75 kDa (O'Regan, 2003). OPN is involved in various physiological and pathological events including cell survival, cell signaling, cell-mediated immunity, cellular adhesion, cellular differentiation, inflammation, tissue repair and tumor metastasis (Standal et al., 2004; Pereira et al., 2006; Rangaswami et al., 2006).

Only a limited number of *T. gondii* secretory proteins have been identified (Zhou et al., 2005). Moreover, the effectors molecules involved in parasite invasion and survival are not well understood. Our aim in this study was evaluate the expression profile of OPN in *T. gondii* tachyzoites and its participation during the interaction parasite–host cell.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Tachyzoites from the virulent RH strain of *T. gondii* were maintained by intraperitoneal passages in female Swiss mice. The parasites were collected 72 h after infection in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2. The suspension obtained from infected mice was centrifuged at $200 \times g$ for 10 min at room temperature to completely remove cells and debris, and the supernatant, which only contained the parasites, was collected

and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The pellet obtained was washed 2 or 3 times with PBS, pH 7.2 and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The parasites were used within 30–40 min after removal from the mouse peritoneal cavity, and the viability was evaluated using dye-exclusion test with Trypan blue (Carvalho and de Souza, 1989). The procedures with animals were carried out in accordance with the guidelines established by the Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ, Committee of Ethics for the Use of Animals, by license CEUA 0229-04.

2.2. Macrophage cultures

Resident macrophages were collected from peritoneal cavities of Swiss mice after injection of PBS, pH 7.2 and then plated on glass coverslips in 24-well plates. After incubation for 1 h at 37°C , the non-adherent cells were removed and DMEM containing 10% fetal calf serum was added. The monolayers of macrophages were cultivated for 24 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere and then, used for the experiments.

2.3. Osteopontin-like protein expression analysis by confocal laser scanning microscopy

T. gondii tachyzoites on coverslips pre-coated with poly-L-lysine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) or macrophage cultures infected with *T. gondii* for 15 min, 30 min, 1 h and 24 h were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.2. Then, the cells were permeabilized for 15 min in PBS containing 0.5% Triton X-100 and indirectly immunolabeled with a monoclonal anti-osteopontin rat primary antibody (1:100; Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) followed by a FITC conjugated anti-rat secondary antibody (Sigma). Controls were performed by omission of the monoclonal primary antibody. The cells were observed under an Olympus BX 51 microscope coupled with an Olympus CLSM FV 300 Fluoview Version 3.3.

2.4. Osteopontin-like protein detection by immunoelectron microscopy

Extracellular *T. gondii* tachyzoites were collected and fixed with 0.2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, and 0.1% picric acid in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 1 h at room temperature. Afterwards cells were washed in PBS, dehydrated in ethanol and embedded in LRWhite resin (Sigma). For immunolabeling, ultrathin sections were washed with PBS/BSA, quenched with 50 mM ammonium chloride for 30 min, and subsequently incubated overnight with the monoclonal anti-osteopontin rat primary antibody (1:10, Chemicon). The sections were washed with PBS/BSA followed by 1 h incubation with a 10 nm gold-conjugated anti-rat secondary antibody (1:20, Sigma), washed, stained with uranyl acetate, and observed under an EM 906 Zeiss transmission electron microscope. Controls were performed by omission of the monoclonal primary antibody.

2.5. Osteopontin-like protein expression analysis by Western blotting

Extracellular *T. gondii* tachyzoites were washed into PBS and lysed for 1 h on ice in 1% NP-40, 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, supplemented with 0.1 M NaCl and 5 mM EDTA. Solubilised parasites were spun for 30 min at $10,000 \times g$ at 4°C to pellet insoluble debris. Rat fetal skeletal fibroblasts, that are known to express OPN, was used as a positive control (Pereira et al., 2006). The total protein content in the cell extracts was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Cell lysates were denatured in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and heated in a boiling water bath for 3 min. Samples (30 μg of total protein) were resolved by 12% SDS-PAGE and proteins were transferred to PVDF membranes (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Rainbow markers (Amersham Pharmacia Biotech) were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20) containing 2% bovine serum albumin and probed with the monoclonal anti-osteopontin rat primary antibody (1:1000, Chemicon) or with the polyclonal anti-osteopontin goat primary antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). After extensive washing in Tween-TBS, PVDF sheets were incubated with biotin-conjugated anti-rat IgG antibody (1:1000, Sigma) or with biotin-conjugated anti-goat IgG antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), respectively, for 1 h and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:1000; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, USA). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine (0.5 mg/ml in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4; Sigma) staining.

2.6. mRNA expression of osteopontin-like protein by RT-PCR

Extracellular *T. gondii* tachyzoites were isolated as described above. The Trizol method was used to obtain total

RNA. Total RNA was quantified by absorbance at 260 nm. After DNase treatment (RQ1 RNase-Free DNase; Promega, São Paulo, SP, Brazil), extracted RNAs (2.0 μg) were reverse-transcribed into cDNA using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase and oligo (dT) 15 primer (Promega), following the manufacturer's protocol. cDNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with GoTaqDNA polymerase (Promega) using a GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). The sequences of the primers for murine OPN (GI 21435805) were 5'-TGTGTCCTCTGAAGAAAAGGATGAC-3' (sense) and 5'-TCTGTGGCATCAGGATACTGTTCA-3' (antisense) (Dialab Diagnostics, MG, Brazil). The sequences of the primers for *T. gondii* Beta Tubulin (TUB2—GI 161938), used as an internal control, were 5'-ATGCAGGCGCGGCGACATCG-3' (sense) and 5'-CGGACCCGCGCGAACGCTGTCC-3' (antisense) (Dialab Diagnostics). The predicted lengths of the fragments were 335 bp for OPN and 129 bp for TUB2. The PCR protocols were as follows: 95°C hot start, 27 cycles at 95°C for 60 s, 54°C for 60 s, and 72°C for 26 s. The PCR products were separated on a 1.5%-agarose gel containing ethidium bromide and visualized with UV light. The analysis was done by measuring the intensities of the bands corresponding to the amplified fragments using Photoshop software (Adobe Systems, Mountain View, CA). The values corresponding to OPN mRNA were measured in relation to the mRNA levels of the housekeeping gene TUB2.

3. Results

3.1. Osteopontin-like protein expression analysis by confocal laser scanning microscopy

There was an intense positive labeling for an OPN-like protein as small dots dispersed over the cytoplasm of extracellular *T. gondii* tachyzoites shown by confocal microscopy (Fig. 1).

During the first hour following macrophage invasion it was observed a positive labeling for OPN-like protein at the

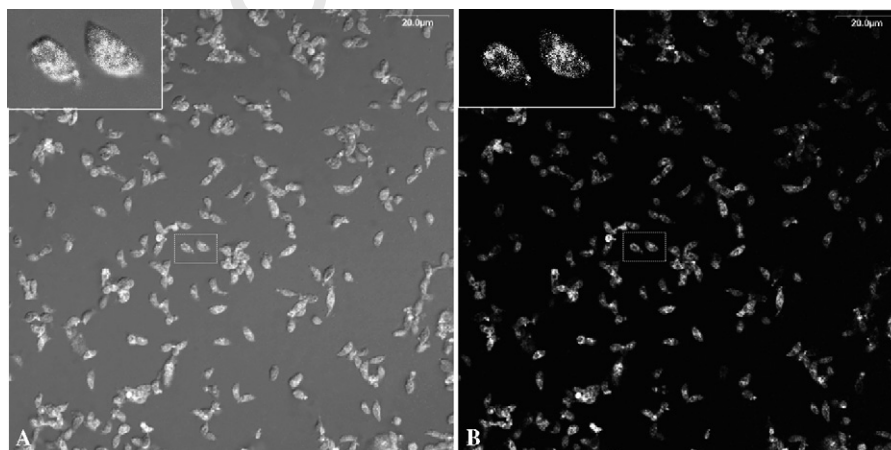


Fig. 1. (A) Overlay of fluorescence and DIC images and (B) fluorescence of isolated *Toxoplasma gondii* tachyzoites immunolabeled with a monoclonal anti-osteopontin primary antibody. Parasites show an OPN-like protein expression with a dotted typical pattern of dense granules, showed at the inset in detail.

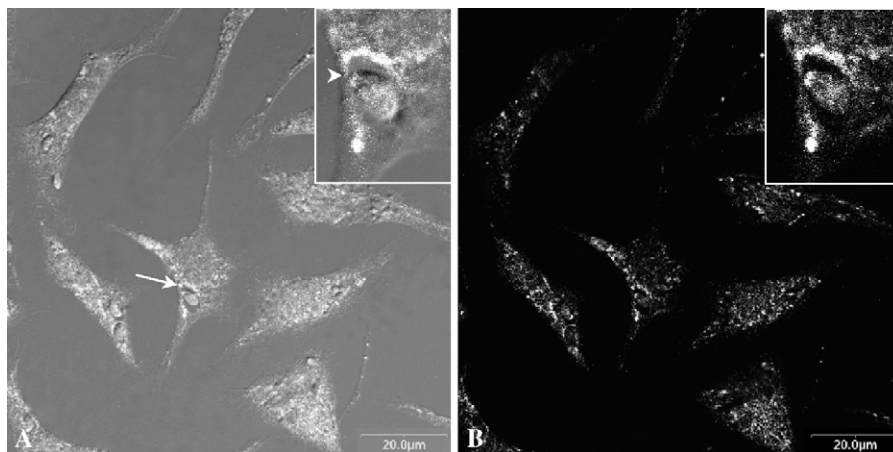


Fig. 2. (A) Overlay of fluorescence and DIC images and (B) fluorescence of macrophages infected with *Toxoplasma gondii* for 1 h immunolabeled with a monoclonal anti-osteopontin primary antibody. The protein is localized at the sub-apical portion of some parasites (arrowhead) and also at the membrane of some parasitophorous vacuole (arrows), showed at the inset in detail. The labeling can also be observed at the macrophage cytoplasm.

233
234 membrane of some PV and also at the sub-apical portion of
235 some parasites (Fig. 2). After 24 h of infection, the sub-apical
236 positive labeling for OPN-like protein was intense at
237 intravacuolar parasites and it was still localized at the PVM
238 (Fig. 3). Macrophages also showed a positive labeling dispersed
239 over the cytoplasm during all infection time, since these cells
240 are known to express OPN (Figs. 2 and 3). The control assays
241 made in the absence of the monoclonal primary antibody
242 presented no labeling, confirming the specificity of the reaction
243 (data not shown).

244 3.2. Osteopontin-like protein detection by immunoelectron 245 microscopy

246 Incubation of ultrathin sections of LRWhite embedded *T.*
247 *gondii* tachyzoites in the presence of monoclonal anti-
248 osteopontin primary antibody confirmed the localization of
249 the OPN-like protein in the dense granules (Fig. 4). No labeling
250 was seen in the rhoptries or micronemes. The control assays
251 made in the absence of the primary antibody presented no

251
252 labeling, confirming the specificity of the reaction (data not
253 shown).

254 3.3. Osteopontin-like protein expression analysis by 255 Western blotting

256 Western blotting was performed using both monoclonal and
257 polyclonal anti-OPN primary antibodies from distinct manu-
258 facturers, which revealed the same protein band. The results
259 confirmed the immunofluorescence and immunoelectron
260 microscopy data, that an OPN-like protein is expressed by
261 extracellular *T. gondii* tachyzoites (Fig. 5).

262 3.4. mRNA expression of osteopontin-like protein by RT- 263 PCR

264 To determine the OPN-like protein expression gene, the
265 mRNA of purified extracellular *T. gondii* tachyzoites was
266 determined by RT-PCR. The results showed the mRNA
267 expression of this protein (Fig. 6).

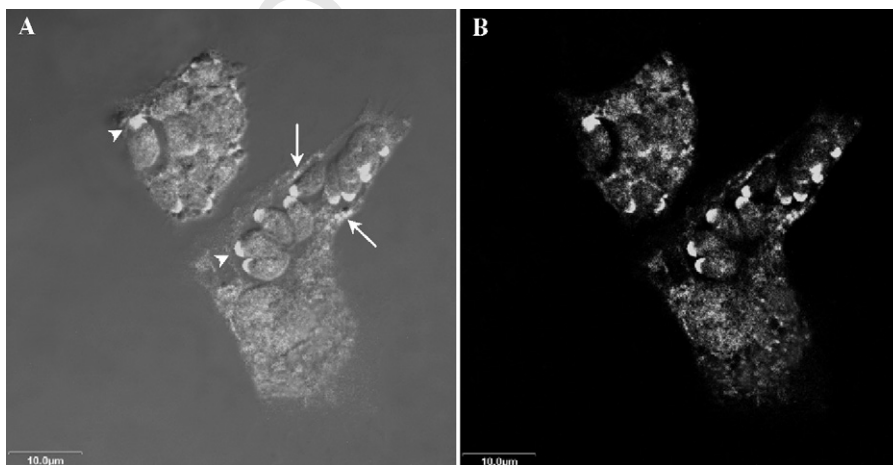


Fig. 3. (A) Overlay of fluorescence and DIC images and (B) Fluorescence of macrophages infected with *Toxoplasma gondii* for 24 h immunolabeled with a monoclonal anti-osteopontin primary antibody. The intravacuolar parasites show an intense labeling for OPN-like protein at the sub-apical portion (arrowheads). The protein is still localized at the parasitophorous vacuole membrane (arrows).

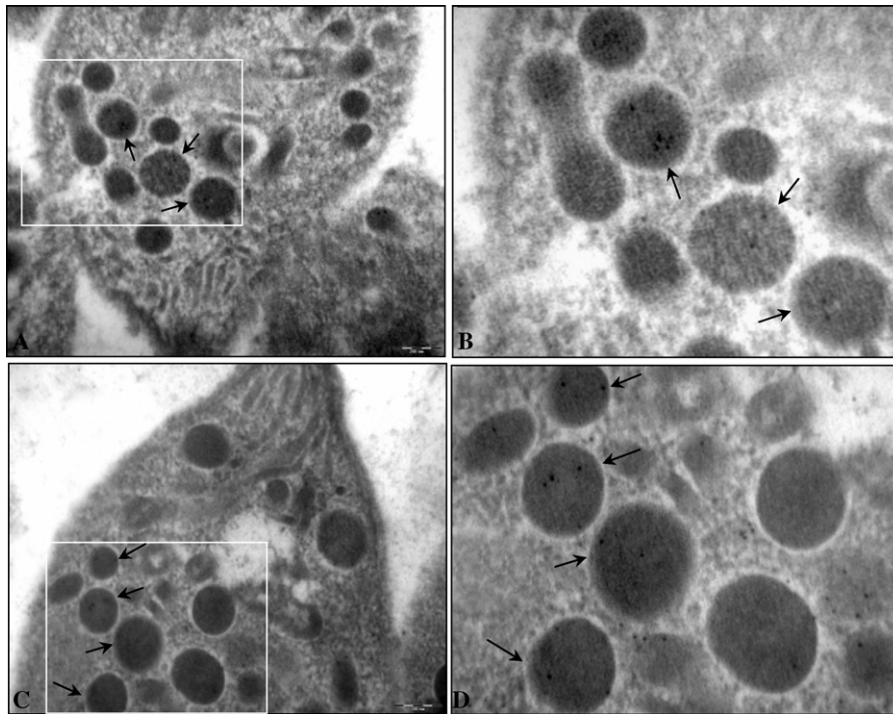


Fig. 4. (A and C) Transmission electron microscopy of *Toxoplasma gondii* tachyzoites immunolabeled with monoclonal anti-osteopontin primary antibody. (B and D) Selected areas of (A and C) showing in details the dense granules localization of the 10 nm colloidal gold particles (arrows).

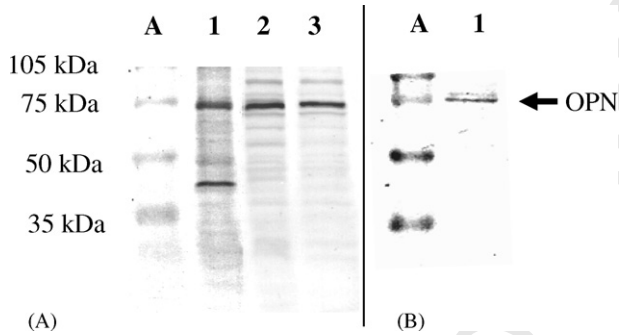


Fig. 5. OPN-like protein expression by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. (A) Lane 1 shows lysate from rat skeletal fibroblasts with OPN expression (positive control). Lanes 2 and 3 show two different samples of lysates derived from isolated tachyzoites stained with a polyclonal anti-osteopontin primary antibody. (B) Lane 1 shows lysate from isolated tachyzoites stained with a monoclonal anti-osteopontin primary antibody. The same protein band is detected in all lanes. The molecular weight observed is consistent with electrophoretic mobility described for osteopontin.

4. Discussion

The confocal microscopy analysis demonstrated an intense labeling for an OPN-like protein as small dots within *T. gondii* tachyzoites. This pattern is well described as a typical feature of DG proteins (Adjogble et al., 2004). A definitive proof was obtained by immunoelectron microscopy performed on extracellular parasites with the monoclonal anti-OPN antibody,

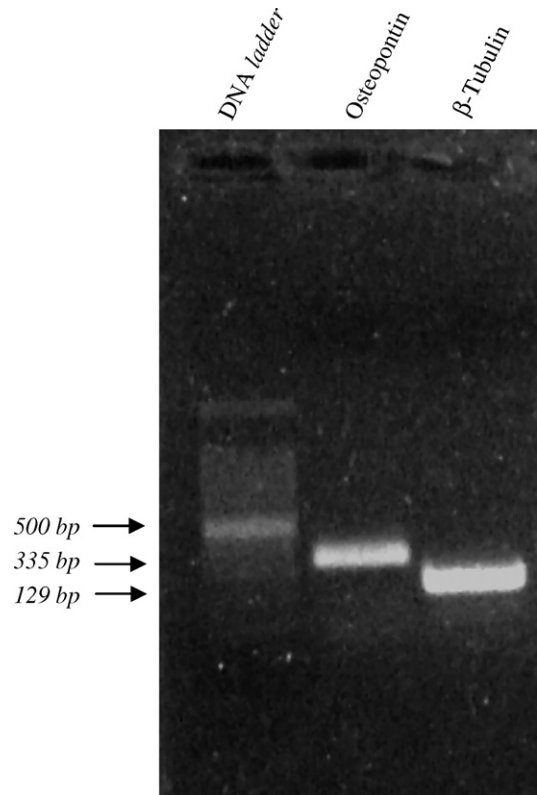


Fig. 6. RT-PCR performed using murine osteopontin and *Toxoplasma gondii* Beta Tubulin (control) probes. Agarose gel shows the mRNA expression of an OPN-like protein by isolated extracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites.

which confirmed the localization of an OPN-like protein in DG. This protein expression in extracellular tachyzoites was also confirmed by Western blotting, which revealed a protein band with the molecular weight consistent to the electrophoretic mobility described for OPN, and by RT-PCR, which showed the presence of mRNA for an OPN-like protein.

Release of DG proteins into the vacuole occurs constitutively during the intravacuolar development of the parasite or via a burst of secretion which specifically takes place shortly after PV formation (Carruthers and Sibley, 1997). Following DG secretion from the sub-apical portion of the parasite, most of the GRA proteins appear as both a soluble and a membrane-associated form in the vacuole. Within this compartment they associate specifically either with the PVM (Ossorio et al., 1994; Fischer et al., 1998; Lecordier et al., 1999; Carey et al., 2000) or with the intravacuolar network (Sibley et al., 1995; Lecordier et al., 1999; Adjogble et al., 2004). Our results showing an intense positive labeling for OPN-like protein at the sub-apical portion of *T. gondii* and its localization at the PVM after macrophage invasion are in agreement with Adjogble et al. (2004) which demonstrated a similar labeling pattern for the DG protein, GRA9, by immunofluorescence microscopy. These data reinforce our suggestion that this protein may be expressed and secreted by *T. gondii* tachyzoites, specifically by the DG.

Although the function of DG proteins is not completely understood, in *T. gondii*, their burst of secretion into PV during the first hour following host cell invasion, and their selective targeting largely contribute to the making of this new PV compartment, and would have important functions in the vacuole metabolism (Carruthers and Sibley, 1997; Mercier et al., 2005). We demonstrated here that *T. gondii* tachyzoites express an OPN-like protein in the DG and that this protein is found in association with the PVM, in agreement with the features described above for DG proteins. Therefore, we could speculate that this OPN-like protein, associated with the GRA-proteins, participates during the parasite interaction process with host cell and PV formation, contributing for the success of the intracellular parasitism of *T. gondii*.

Acknowledgments

Supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). The text was thoroughly revised in English by Prof. Paul Dykstra of London. We would like to thank Alan Cesar Nunes de Moraes for the technical support on electron microscopy.

References

Adjogble, K.D., Mercier, C., Dubremetz, J.F., Hucke, C., Mackenzie, C.R., Cesbron-Delauw, M.F., Daubener, W., 2004. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* 34, 1255–1264.

Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607–623.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brossier, F., Sibley, L.D., 2005. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2266–2272.

Carey, K.L., Donahue, C.G., Ward, G.E., 2000. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 25–37.

Carruthers, V.B., Boothroyd, J.C., 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 83–89.

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.

Carvalho, L., de Souza, W., 1989. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J. Protozool.* 36, 164–170.

Cesbron-Delauw, M.F., Lecordier, L., Mercier, C., 1996. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 59–65.

Cortez, E., Stumbo, A.C., de Carvalho, T.M., Barbosa, H.S., Carvalho, L., 2005. NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. *J. Parasitol.* 91, 1052–1057.

de Souza, W., 2005. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem. Cell Biol.* 123, 1–18.

Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., Berman, J.S., 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.* 107, 1055–1061.

Dubremetz, J.F., 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.* 9, 841–848.

Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H.E., Reichmann, G., 1998. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 251–262.

Hartner, A., Porst, M., Gauer, S., Prols, F., Veelken, R., Hilgers, K.F., 2001. Glomerular osteopontin expression and macrophage infiltration in glomerulosclerosis of DOCA-salt rats. *Am. J. Kidney Dis.* 38, 153–164.

Heintzelman, M.B., 2006. Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. *Int. Rev. Cytol.* 251, 79–129.

Henriquez, F.L., Nickdel, M.B., McLeod, R., Lyons, R.E., Lyons, K., Dubremetz, J.F., Grigg, M.E., Samuel, B.U., Roberts, C.W., 2005. *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitology* 131, 169–179.

Kim, K., 2004. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Trop.* 91, 69–81.

Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L.D., Cesbron-Delauw, M.F., 1999. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell* 10, 1277–1287.

Lemgruber, L., De Souza, W., Vommaro, R.C. Freeze-fracture study of the Q1 dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron*, in press.

Li, G., Oparil, S., Kelpke, S.S., Chen, Y.F., Thompson, J.A., 2002. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation* 106, 854–859.

Liendo, A., Stedman, T.T., Ngo, H.M., Chaturvedi, S., Hoppe, H.C., Joiner, K.A., 2001. *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 18272–18281.

Martin, A.M., Liu, T., Lynn, B.C., Sinai, A.P., 2007. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54, 25–28.

Mercier, C., Adjogble, K.D., Daubener, W., Delauw, M.F., 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35, 829–849.

- 396 Murry, C.E., Giachelli, C.M., Schwartz, S.M., Vracko, R., 1994. Macrophages
398 express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.*
399 145, 1450-1462. 413
- 400 O'Regan, A., 2003. The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth*
401 *Factor Rev.* 14, 479-488. 414
- 402 Oldberg, A., Franzen, A., Heinegard, D., 1986. Cloning and sequence
403 analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-
404 Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8819-
405 8823. 415
- 406 Ossorio, P.N., Dubremetz, J.F., Joiner, K.A., 1994. A soluble secretory protein
407 of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the para-
408 sitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J. Biol.*
409 *Chem.* 269, 15350-15357. 416
- 410 Pereira, R.O., Carvalho, S.N., Stumbo, A.C., Rodrigues, C.A., Porto, L.C.,
411 Moura, A.S., Carvalho, L., 2006. Osteopontin expression in coculture of
412 differentiating rat fetal skeletal fibroblasts and myoblasts. *In Vitro Cell Dev.*
413 *Biol. Anim.* 42, 4-7. 417
- Prince, C.W., Butler, W.T., 1987. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the
biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in
clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Coll. Relat. Res.* 7, 305-313. 418
- Rangaswami, H., Bulbule, A., Kundu, G.C., 2006. Osteopontin: role in cell
signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 16, 79-87. 419
- 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
tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma*
gondii. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 4), 1669-1677. 420
- Standal, T., Borset, M., Sundan, A., 2004. Role of osteopontin in adhesion,
migration, cell survival and bone remodeling. *Exp. Oncol.* 26, 179-184. 421
- Zhou, X.W., Kafsack, B.F., Cole, R.N., Beckett, P., Shen, R.F., Carruthers, V.B.,
2005. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse
legion of invasion and survival proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 34233-34244. 422
- Zinecker, C.F., Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T., 1998.
The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein
containing O-linked oligosaccharides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 241-246. 423
424
425
426
427
428
429
430

UNCORRECTED PROOF

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](#)