

**INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* AUMENTA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS
PERITONEAIS QUE ALTERAM A FAGOCITOSE DE LEVEDURAS POR
MACRÓFAGOS**

Luiz Renato Maia Maciel

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RIO DE JANEIRO
AGOSTO- 2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Infecção por *Toxoplasma gondii* aumenta a produção de proteínas peritoneais que alteram a fagocitose de leveduras por macrófagos

Mestrando: Luiz Renato Maia Maciel

Orientador: Renato Augusto DaMatta

Dissertação de Mestrado apresentado ao Centro de Biociências e Biotecnologia como parte das exigências do Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, com ênfase em Biologia Celular.

Campos dos Goytacazes, RJ

Agosto, 2006

Infecção por *Toxoplasma gondii* aumenta a produção de proteínas peritoneais que alteram a fagocitose de leveduras por macrófagos

Luiz Renato Maia Maciel

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação *Strito sensu* em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Mestre.

Aprovada em 7 de agosto de 2006

Comissão examinadora:

Prof^a Dra. Andrea Cristina Vetö Arnholdt (CBB/UENF)

Prof. Dr. Maria de Fátima Sarro da Silva (CBB/UENF)

Prof. Dr. Sergio Enrique Seabra (UEZO)

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (CBB/UENF)

Orientador

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação do Dr. Renato Augusto DaMatta e com financiamento da UENF, FAPERJ, e CNPq.

Dedicatória

Dedico este trabalho a pessoas queridas como meus pais, minha esposa, meu filho e meu orientador.

Agradecimentos

- A Deus por iluminar, conduzir e dar-me sabedoria sempre em minhas decisões.
- Aos meus pais, Licínio e Jociléa pelos ensinamentos diários, por conceder-me a maior herança nesta vida, a educação e por muitas vezes abrir mão de seus sonhos para que o meu fosse realizado. Amo vocês.
- A minha esposa Vivianne, por todo carinho e admiração. Por estar sempre ao meu lado, mostrando ser sempre a companheira perfeita e a amiga de todas as horas. Por mostrar-me a verdadeira felicidade. Pela compreensão nos momentos difíceis, por compartilhar suas idéias e seus sentimentos, seu amor. Além de conceder-me a maior alegria da vida, ser pai.
- Ao meu filho Eduardo por simplesmente ser a razão da minha vida.
- Aos meus irmãos Everaldo, Fábio e Licínio Junior pelo companheirismo, amizade e fraternidade.
- A todos que compreenderam minha ausência em momentos importantes na família, devido à realização desse trabalho.
- Aos meus parentes pela atenção, dedicação, carinho e admiração, em especial a tia Lizete, meu primo Leonardo Gomes, minhas cunhadas Andréia e Natália e a minha sobrinha Lara.
- Ao meu sogro e minha sogra pela admiração e pelas constantes ajudas.
- Ao Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta, pela amizade, por ser de fato um verdadeiro orientador mostrando ser verdadeira a frase do poeta que diz “*depois de você os outros são os outros*”. Por acreditar em seus alunos e lutar junto com eles na superação dos trabalhos e dos problemas pessoais. Agradeço muito a você pela atenção, pelos momentos agradáveis ao longo desses 6 anos de trabalho. Além dos ensinamentos e também pelas inúmeras conversas sérias em sua sala, sentado na cadeira branca de plástico. Podemos diferenciá-lo de um simples orientador, pelo fato de morar no coração de cada um de seus alunos. Esteja certo que estarei torcendo por você, tenho certeza que só obterá sucesso em sua viagem. Que aproveite esse período para realizar coisas novas. Obrigado em nome de todos os seus alunos pelo lema ensinado de “ser pro - ativo no laboratório em busca da quebra dos paradigmas”. Principalmente, obrigado por sempre ter acreditado em mim.
- A todos os professores do LBCT, em especial o prof. Edésio pelos ensinamentos e pela ajuda.
- Ao professor Cláudio pela colaboração no trabalho, através das caracterizações das proteínas, sendo fundamental para os nossos resultados. Além da revisão feita neste trabalho.

- As técnicas, Giovana, Márcia Adriana, Adrianinha, Artur, Bia, Noil e especialmente, Darli e Rose, por todos os ensinamentos e descontrações no trabalho. Ao Fábio pelas inúmeras ajudas no infectório e no dia-dia.
- A todos os funcionários do CBB, em especial a Dona Maria.
- Aos companheiros e amigos do laboratório, Cristiane, Cíntia, Carla, Tatiane, Carol, Glauber, Joseph, Elaine, Diego Zulu, Sérgio Bonadiman, Juliana Azevedo, Juliana Padrão e Laura pelos momentos agradáveis e pela ajuda.
- A professora e coordenadora Andréa Arnholdt pela ajuda
- Ao amigo Sérgio Seabra pelos ensinamentos, conversas e pela idéia de iniciar este trabalho.
- A Andréa e Celeste pelas cobranças na elaboração e defesa, por estarem sempre me orientando e preocupadas com a finalização dessa tese.
- E a todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram apenas com apenas um sorriso, pois este simples gesto me deu incentivo para chegar até aqui.

Lista de abreviaturas

0_{c/} - Meio condicionado por *Toxoplasma gondii* na qual o parasita foi colocado e retirado imediatamente

0_{c/2} - Meio condicionado por *Toxoplasma gondii* na qual o parasita foi lavado quatro vezes com PBS por centrifugação antes de sua adição ao meio

CM – Meio condicionado por *Toxoplasma gondii*

CRD - Domínio de reconhecimento a carboidrato

DC – Células dendríticas

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Médium

GM-CSF - Fator estimulante de colônia de granulócito- macrófago

IFN- γ - Interferon- γ

IgG – Imunoglobulina G

IGY – Imunoglobulina Y

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-2 - Interleucina 2

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

iNOS – Nitric Oxide sintetase induzida

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MR – Receptor manose

NF-kB - Fatores de transcrição nuclear

NO – Óxido nítrico

SD – receptor sialoadesina

SFB – Soro fetal bovino

sMR – Receptor manose solúvel

SPWi - Sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado

SPWi tratado - Sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado tratado com altas concentrações de leveduras

SPWn - Sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo normal

TGF- β - Fator de transformação do crescimento

TNF α – Fator de necrose tumoral

Índice

1 - Resumo	1
2 – Abstract	2
3 – Introdução	3
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	3
3.2 Macrófago	6
4 - Justificativa	12
5 – Objetivos	13
6 - Materiais e Métodos	14
6.1 - Cultura de macrófagos	14
6.2 - <i>Toxoplasma gondii</i>	14
6.3 - Obtenção de meios condicionados por <i>T. gondii</i>	14
6.4 - Obtenção de sobrenadante de lavado peritoneal de camundongo normal ou infectado por <i>T. gondii</i>	14
6.5 – Ativação de macrófagos	15
6.5.1 - Produção de Óxido Nítrico	15
6.6 - Interação com levedura	15
6.7 - Interação com hemácias	15
6.8 - Eletroforese de diferentes MC, SPWn, SPWi e SPWi tratado	16
7 – Resultados	17
8- Discussão	31
9- Conclusões	36
10- Referências bibliográficas	37

Índice de tabelas

Tabela 1	17
Tabela 2	18
Tabela 3	23
Tabela 4	25
Tabela 5	26
Tabela 6	29
Tabela 7	30

Índice de figuras

Figura 1	19
Figura 2	20
Figura 3	22
Figura 4	24
Figura 5	27
Figura 6	28

1) Resumo

T. gondii é um parasita capaz de desativar macrófagos. Este parasita secreta substâncias durante a invasão celular causando desativação e reação inflamatória no hospedeiro. Uma das formas de estudar substâncias secretadas é trabalhar com meios condicionados (CM) por *T. gondii*. Para tal, *T. gondii* obtido de peritônio foi incubado com DMEM a 37°C por 0 a 30 min e 1, 6, 12 e 24h. Parasitas também foram lavados antes de serem adicionado ao DMEM. DMEM foi usado para obter sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo normal (SPW_n) ou infectado (SPW_i). Para determinar se as proteínas inflamatórias ou secretadas pelo *T. gondii* poderiam modular as funções do macrófago, CM, SPW_n e SPW_i foram usados com soro fetal bovino para cultivar macrófagos e a fagocitose de leveduras e hemácias opsonizadas analisadas. Além disso, a produção de óxido nítrico foi verificada após ativação de macrófagos cultivados com CM. Leveduras também foram incubadas com SPW_i (SPW_i-treated) para remover componentes com afinidade para leveduras, o sobrenadante foi usado para cultivar macrófago. Todos os CM e SPWs foram analisado por SDS-PAGE. Após 24h de cultivo nos diferentes meios a fagocitose foi quantificada através da microscopia óptica. O Perfil protéico dos diferentes CM e SPW foram similares. Contudo, a concentração das proteínas aumentou na seguinte ordem: CM onde o parasita foi lavado e utilizado, CM com longos períodos de incubação, SPW_n, e SPW_i. Macrófagos cultivados com CM ou SPW apresentaram diminuição na fagocitose de leveduras e aumento na adesão. SPW_i apresentou maior capacidade modulatória. Contudo, esta modulação não foi detectada na fagocitose de hemácias opsonizadas. Ademais, aumento na adesão das hemácias foi detectada devido à expressão de sialoadesina na superfície dos macrófagos. Além disso, células cultivadas com CM apresentaram aumento na produção de óxido nítrico. Proteína do SPW_i-tratado de aproximadamente 140kDa apresentou redução na análise por SDS-PAGE e a fagocitose de leveduras por macrófagos cultivados neste lavado foi similar ao controle. Em conclusão, as proteínas do CM e SPW não foram secretadas pelo *T. gondii*, mas são da cavidade peritoneal do camundongo. Estas inibem a interiorização de leveduras pelos macrófagos, tem afinidade por componentes da superfície de leveduras e induzem a expressão de sialoadesina em macrófagos. Sugerimos que esta proteína é o receptor de manose que fica adsorvido na superfície do macrófago. Esta adsorção aumenta a adesão e diminui a interiorização, pois essa forma do receptor não apresenta o domínio intracelular. Esta modulação pode ser induzida pelo *T. gondii* como um mecanismo de evasão da célula hospedeira.

Palavras chave: 1- Macrófago; 2- *Toxoplasma gondii*; 3- Meio condicionado; 4- Fagocitose de levedura; 5- Receptor de manose.

2) Abstract

T. gondii is a parasite capable of deactivating macrophages. This parasite secretes substances during cell invasion that may cause this deactivation and also generate an inflammatory reaction by the host. One approach to study secreted substances is to work with *T. gondii* conditioned medium (CM). For that, peritoneal *T. gondii* was incubated with DMEM at 37°C for 0 to 30 min and 1, 6, 12 and 24h. Parasites were also washed before addition into DMEM. DMEM were used to obtain supernatant of peritoneal washes of normal (SPWn) or infected (SPWi) mice. To determine if the *T. gondii* secretion and host inflammatory proteins could modulate macrophage function, CM, SPWn and SPWi were used with fetal bovine serum to culture macrophages and yeast cell and opsonize erythrocytes uptake determined. Furthermore, nitric oxide production was assay after macrophage activation and culture in CM. Yeasts cells were also incubated with SPWi (SPWi-treated) to remove components with yeast cell affinity, the supernatants was used to cultivate macrophage. All CM and SPWs were analyzed through SDS-PAGE. After 24h cells uptake was assayed by light microscopy. Protein profiles of the different CM and SPW were similar. However, protein concentrations increased in the following order: CM where washed parasites were used, CM with longer periods of incubation, SPWn, and SPWi. Macrophages cultured in CM or SPW presented a decrease in yeast phagocytosis and increase in adherence. SPWi presented the highest modulation capacity. However, this modulation was not detected in opsonize erythrocytes phagocytosis by macrophages. However, an increase in adherence of erythrocytes was detected due to sialoadhesin expression. Furthermore, cells cultured with CM presented an increase in nitric oxide production. When SPWi-treated was analyzed by SDS-PAGE protein band of about 140 kDa was reduced and yeast cell uptake was similar to control. In conclusion, proteins from the CM and SPW were not from *T. gondii* secretion, but from the mice peritoneal cavity. They down modulated the uptake of yeast cells, have an affinity for yeast cell components and induce sialoadhesin expression. We suggest what this protein is the soluble mannose receptor that adsorbed at the macrophages surface. This adsorption increased yeast adherence and decreased internalization because this receptor form do not present its intracellular domain. This modulation may be induced by *T. gondii* as an evasion mechanism of host cells.

Key words: 1- Macrophages; 2- *Toxoplasma gondii*; 3- Conditioned Medium; 4- Yeast Phagocytosis; 5- Mannose Receptor.

3) Introdução

3.1) *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário patogênico, intracelular obrigatório, agente etiológico da toxoplasmose. Este parasita pertence ao filo Apicomplexa que agrupa protozoários de forma alongada que possuem, na sua porção anterior, um complexo apical especializado. Este complexo é constituído de organelas como róptrias, micronemas e conóide (Denkers e Gazzinelli, 1998; Morissete e Sibley, 2002). O *T. gondii* é capaz de infectar e se multiplicar em qualquer célula nucleada de animais endotérmicos (Denkers e Gazzinelli, 1998; Dubey, 1998; Sibley, 2003). Este parasita apresenta três formas infectantes:

* Taquizoítos – Encontrado na fase aguda da infecção. Caracteriza-se pela rápida proliferação intracelular.

* Bradizoítos – Encontrado dentro de cistos teciduais. Caracteriza-se pela lenta proliferação.

* Esporozoitos – Encontrado dentro de oocistos produzidos nas células epiteliais dos felídeos. Oocistos liberados nas fezes sofrem esporulação no ambiente dando origem a esporocistos e no seu interior esporozoítos que, quando liberados, invadem tipos celulares variados (Gazzinelli *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1996; Yap & Sher, 1999; Aliberti, 2005).

O ciclo de vida do *T. gondii* apresenta-se em dois tipos de hospedeiros: intermediário (vários animais de sangue quente, incluindo o homem) e definitivo (família Felidae) (Denkers e Gazzinelli, 1998; Frenkel, 2000; Rey, 1991). Nos gatos, o ciclo ocorre através da ingestão de presas contaminadas com taquizoítos ou cistos teciduais (contendo bradizoítos) e, ainda, por infecção através da ingestão de oocistos. Posteriormente, bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos invadem o epitélio intestinal. Essas formas infectantes se multiplicam por endodiogenia dando origem a gametócitos. Após o processo de fecundação ocorrerá a formação de oocistos não esporulados. Estes oocistos serão liberados no ambiente onde se maturarão (Gazzinelli *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1996; Yap & Sher, 1999; Rey, 1991; Aliberti, 2005). Já no hospedeiro vertebrado, o ciclo ocorre através da ingestão de: a) oocistos presentes em alimentos ou água contaminada; b) taquizoítos eliminados através de fluidos corporais ou c) cistos teciduais (contendo bradizoítos) presentes em carnes mal passadas. Estas formas infectam as células nucleadas, sofrem rápida multiplicação por endodiogenia e formam vários taquizoítos. Esses taquizoítos arrebentam as células e são liberados, infectando novas células (Gazzinelli *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1996; Yap & Sher, 1999; Rey, 1991; Aliberti, 2005).

O *T. gondii* entra na célula hospedeira por fagocitose ou por penetração ativa (Werk, 1985; Dobrowolski e Sibley, 1996; Dobrowolski *et al.*, 1997; Dowse, T. & Soldati D., 2004).

A penetração ativa envolve a participação do citoesqueleto do parasita, enquanto que a célula hospedeira não possui um papel ativo nesse tipo de entrada (Dobrowolski e Sibley, 1996; Sibley, 2004). Esse processo é importante para que o *T. gondii* possa burlar o sistema microbicida da célula hospedeira e assim se multiplicar. Dentre os mecanismos de escape dependente de parasita vivo e, portanto, de penetração ativa, podemos citar a inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2002), indução na produção de TGF-beta1 através da exposição de fosfatidilserina em sua superfície (Seabra *et al.*, 2004), Redução na expressão de moléculas de adesão de macrófagos infectados (Da Gama *et al.*, 2004.) e a inibição da fusão de componentes da via endocítica e exocítica ao vacúolo parasitóforo (Mordue *et al.*, 1999; Jones & Hirsch, 1972). Além disso, o *T. gondii* apresenta laminina em sua superfície que media a adesão com receptores $\alpha\beta 1$ da célula hospedeira. Dessa forma, o parasita tem habilidade de invadir grande quantidade de células nucleadas (Furtado *et al.*, 1992). Durante o processo de invasão, o *T. gondii* adere à superfície da célula hospedeira, através do complexo apical (Silva *et al.*, 1982) e libera os conteúdos de suas organelas. Proteínas das micronemas são importantes na invasão do *T. gondii* sendo as primeiras a serem secretadas (Carruthers *et al.*, 1999; Dowse, T. & Soldati D., 2004), as de róprias estão envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo (Hakansson *et al.* 2001; Sibley, 2004) e as de grânulos densos, na sobrevivência do parasita após a invasão (Blackman & Bannister, 2001). Dessa forma, é grande o interesse em torno da identificação das moléculas secretadas pelo *T. gondii* durante a invasão e multiplicação.

Estudos têm demonstrado grande interesse nas proteínas contidas nas micronemas (MICs). Isso ocorre, pois elas participam do processo de ataque e invasão do parasita, podendo ser alvo para tratamentos terapêuticos (Brossier e Sibley, 2005). Muitas MICs (MIC1-4) apresentam um domínio com afinidade para proteínas presentes na matriz extracelular da célula hospedeira que contribui para o processo de adesão do parasita à célula hospedeira (De Souza, 2005). Estudos mostram que MIC1 tem afinidade para lectinas (Lourenço *et al.*, 2001) e a deleção do gene codificador de MIC1 diminui a invasão do parasita em fibroblastos (Cerede *et al.*, 2005). Já a MIC2 possui afinidade para integrinas (ICAM1) (Barragan *et al.*, 2005) e glicosaminoglicanos (Harper *et al.*, 2004). Além disso, MIC2 forma um complexo protéico de 450kDa com uma segunda proteína das micronemas, a M2AP (Jewett e Sibley, 2004). Esse complexo é importante para a secreção do conteúdo das micronemas, para a viabilidade do parasita e para a sua penetração na célula hospedeira (Jewett e Sibley, 2004; Brossier e Sibley, 2005; Huynh *et al.*, 2003). Estudos têm revelado que esses processos são dependentes de liberação de Ca^{+2} pelo parasita (Carruthers *et al.*,

1999; Bouchot *et al.*, 1999; Veira e Moreno, 2000). O domínio citoplasmático da MIC2 facilita a associação com o citoesqueleto do parasita. Dessa forma, cria-se uma ligação forte entre os receptores da célula hospedeira e a maquinaria de actina-miosina do parasita facilitando sua movimentação e contribuindo para o processo de invasão (Jewett e Sibley, 2003; Brossier e Sibley, 2005). Após ser secretada pelas micronemas, a MIC 2 é clivada por proteases no seu domínio transmembrana e liberada da superfície do *T. gondii* (Carruthers *et al.*, 2000). Estudos recentes demonstram que essa liberação é importante no processo de invasão do parasita (Brossier e Sibley, 2005).

Estudos citoquímicos mostram a presença de glicoconjugados e moléculas com afinidade para lectinas no interior das róptrias (Carvalho *et al.* 1991). Além disso, diversas proteínas secretadas pelo *T. gondii* já foram identificadas. Dentre elas podemos citar as presentes nas róptrias como ROP1 (60kDa) e ROP2 (54kDa) (De Souza, 2005). Alguns trabalhos sugeriam que a ROP1 era fundamental para o processo de penetração do *T. gondii* (Schwartzman 1986; Lycke *et al.*, 1968). No entanto, estudos revelaram que *T. gondii* com supressão no gene para ROP1 não apresentaram alteração no processo de invasão no hospedeiro (Kim e Boothroyd, 1993). ROP2 é uma proteína transmembrana, secretada no momento da invasão, que se liga à membrana do vacúolo parasitóforo contribuindo para associação com as mitocôndrias e retículo endoplasmático (Sinai & Joiner, 2001), desaparecendo após sua maturação (Saffer *et al.*, 1992; Beckers *et al.*, 1994). Uma outra proteína presente nas róptrias é a BRP1. Ela foi recentemente identificada em organelas nascentes durante a primeira divisão de bradizoítos. No entanto isso não se verifica em taquizoítos (Schwarz *et al.*, 2005).

Após a invasão do parasita, o conteúdo dos grânulos densos é liberado para auxiliar na modificação do vacúolo parasitóforo garantindo a sobrevivência do parasita (Blackman & Bannister, 2001). Várias proteínas têm sido identificadas nos grânulos densos (De Souza, 2005). GRA1 (22-27kDa) é uma proteína abundante no vacúolo parasitóforo. Acredita-se que esta proteína esteja envolvida na homeostase de íons de Ca^{+2} no interior do vacúolo (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). GRA2 (28,5kDa) tem papel importante na virulência do parasita (Mercier *et al.*, 1998). Estudos moleculares sugerem que GRA4, 5, 6, 7, 8 podem constituir uma barreira que permite a passagem de moléculas menores que 1900Da através da membrana vacuolar. (Schwab *et al.*, 1994).

Estudos têm demonstrado que outras proteínas são secretadas pelo *T. gondii* além daquelas presentes nas organelas apicais já descritas. Uma delas é a ciclofilina 18kDa (C-18) que é liberada pelo parasita ficando solúvel no sobrenadante das culturas estimulando a

imunidade celular através da produção de interleucina 12 (IL-12) por células dendríticas (DC) (Aliberti *et al.*, 2003). Essa proteína é abundante nas culturas de fibroblastos infectados por *T. gondii* e é secretada em grande quantidade quando o parasita é incubado a 37°C por trinta minutos, constituindo cerca de 2,4% do total de proteínas presentes no sobrenadante das culturas de *T. gondii* (Aliberti *et al.*, 2003). A indução na produção de IL-12 por DC, ocorre, pois C-18 possui alta afinidade para o receptor CCR5, um receptor de DC que é importante no processo de sinalização para a produção de IL-12 induzida por parasitas (Yap e Sher, 1999). Dessa forma, C-18 é considerado o principal fator de estímulo para a imunidade celular mediada por IL-12. No entanto, estudos sugerem a existência de outros fatores liberados pelo *T. gondii* que estão envolvidos nesse processo (Aliberti, 2003), mas que ainda não estão claros, necessitando de estudos mais aprofundados. Portanto, o uso de meios condicionados é uma boa estratégia para o estudo de substâncias secretadas pelo *T. gondii*.

A fagocitose do *T. gondii* é bastante diferente da penetração ativa. Comparando-se os processos pode-se verificar que na fagocitose: a) o vacúolo é de maior tamanho e se acidifica; b) o processo é mais lento; c) ocorre projeção da membrana plasmática ao redor do parasita; d) fusão de lisossomas com o vacúolo parasitóforo é observada; e e) o parasita não necessita estar vivo (Jones & Hirsch, 1972; Sibley, 1995).

3.2) O macrófago

O macrófago é uma célula do sistema imunológico altamente distribuída pelo organismo. Esta célula é a mais diferenciada do sistema mononuclear fagocítico (van Furth *et al.*, 1972). Ela se origina da diferenciação de monócitos sanguíneos após passar para o tecido (van Furth, 1975). Diferente dos monócitos, os macrófagos têm grande quantidade de receptores de superfície descritos, mas nem todos têm suas funções determinadas (revisto por: Auger & Ross, 1992). Essas células possuem características marcantes como esterase citoplasmática não específica, aderência rápida a substratos e heterogeneidade funcional e estrutural (Auger & Ross, 1992).

Macrófagos podem ser classificados basicamente em residentes e ativados. Quando obtidos de organismos não infectados e sem inflamação são denominados residentes, apresentando capacidade mínima de destruir microrganismos, secretando proteases em baixa quantidade, e pouca capacidade para responder a citocinas (Adams & Hamilton, 1984). No entanto, macrófagos obtidos de organismos infectados com patógenos ou estimulados com agentes que causam inflamação adquirem a capacidade de destruir células tumorais e microrganismos, aumentam a capacidade secretora, fagocitam mais, apresentam sistema

vacuolar mais desenvolvido e modulam a quantidade e os tipos de receptores na superfície, sendo denominados de macrófagos ativados (Adams & Hamilton, 1984; 1992).

A ativação dos macrófagos inicia-se por um sinal extracelular que se liga a um receptor transduzindo o sinal para o interior da célula. No citoplasma ocorre a geração de mensageiro secundário que, passando por uma série de etapas, vai alterar a transcrição de genes, codificando proteínas efetoras à determinada função (Adams & Hamilton, 1992). Sabe-se que a ativação dos macrófagos está relacionada à resposta imunológica específica ao antígeno inoculado. Com isso, diversas citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF α) (Talmadge *et al.* 1988), interferon- γ (IFN- γ) (Dinarello & Mier, 1987), interleucina 3 (IL-3) e fator estimulante de colônia de granulócito- macrófago (GM-CSF) (Metcalf, 1989) são liberadas ativando o sistema imunológico. Já citocinas como interleucina 2 (IL-2) (Malkovsky, 1987), interleucina 4 (IL-4) (Paul & Ohara, 1987) e fator de transformação do crescimento (TGF- β) (Xiao *et al.*, 2002) atuam desativando esse sistema. Dessa forma essas citocinas modulam as diversas funções dos macrófagos. (Auger & Ross, 1992).

O macrófago é notável devido às suas funções primordiais no organismo como citotoxicidade celular, apresentação de antígenos, secreção de substâncias, quimiotaxia e fagocitose. Esse processo é de extrema importância na imunidade celular, na captação de nutrientes, na remodelagem de tecidos e na retirada de células senescentes (Metchnikoff, 1891 *apud* Ian, 1973; Conner & Schmid, 2003). A fagocitose tem início com o reconhecimento de moléculas através dos receptores. Para a ocorrência desse processo, a célula conta com uma ampla variedade de receptores que reconhecem o ligante. Muitos destes receptores são modulados podendo, ou não, estar presentes dependendo do estado de maturação, dos estímulos ao redor da célula e do grau de ativação dos macrófagos. Sabe-se que a interação entre a partícula e a superfície do macrófago não ocorre por um receptor isoladamente, mas por múltiplos receptores simultaneamente (Underhill & Ozinsky, 2002). Esta ligação desencadeia um processo de sinalização intracelular que induzirá uma polimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto no local de contato da partícula com a célula. Paralelamente, o complexo de Golgi emite vesículas até a membrana plasmática, no sítio de ligação com a partícula, onde se fundirão. Isso aumentará a capacidade de expansão da membrana, facilitando a emissão dos pseudópodes que envolverão a partícula, formando o fagossomo. Após a interiorização ocorre fusão desse compartimento ao sistema lisossomal iniciando o processo de degradação (Conner & Schmid, 2003).

Macrófagos são considerados apresentadores de antígenos, pois processam moléculas antigênicas e as expressam na superfície celular através do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) (Germain & Margulies, 1993). Após a endocitose do antígeno, suas moléculas são processadas e apresentadas através do MHC classe II aos linfócitos T CD4⁺. A ativação específica desses linfócitos promoverá a liberação de conjuntos de moléculas. Já proteínas virais sintetizadas no retículo são apresentadas através do MHC classe I aos linfócitos T CD8⁺, que irão destruir a célula infectada (Germain & Margulies, 1993).

Diversos receptores são encontrados na superfície de macrófagos. Dentre eles podemos mencionar:

- 1) receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (receptor Fc). (Ravetch, 1997).

Dependendo do grau de ativação, o macrófago pode apresentar diferentes tipos deste receptor (Diamond & Yelton, 1981). O receptor Fc é importante na fagocitose de partículas ligadas à imunoglobulinas (Daèron, 1996; Ravetch, 1997). A ligação do receptor às moléculas de anticorpos resulta em processos celulares como endocitose; geração de sinais intracelulares que resultam na reorganização de componentes do citoesqueleto e numa série de ligações que facilitam a fagocitose e a secreção de potentes mediadores.

Diversos estudos tentam demonstrar os diferentes mecanismos de sinalização envolvidos no processo de fagocitose. No entanto, o mecanismo mais conhecido, é a fagocitose medida pelo receptor Fc. Há três classes de receptores Fc que são efetores na fagocitose de partículas opsonizadas por imunoglobulina G (IgG) em macrófagos humanos. Estas classes incluem os receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA e Fc γ RIIIA (Unkless *et al.*, 1988; Ravetch, 1997). O Fc γ RIIA é uma cadeia protéica simples com uma porção extracelular que reconhece a parte constante da Ig, uma porção transmembrana e uma porção intracelular citoplasmática contendo o domínio ITAM (*immune receptor tyrosine activation motifs*). O aminoácido tirosina deste domínio é fosforilado quando ocorre a aproximação de receptores adjacentes (dimerização do receptor) (Van den Herik-Oudijk *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1995). Os receptores Fc γ RI e Fc γ RIIIA não possuem a porção ITAM. Neste caso, para que desencadeie a sinalização, necessitam interagir com pequenas proteínas transmembranares que possuem a porção ITAM necessária para a transdução de sinal. Dessa forma, a interação entre receptor e anticorpo, que opsoniza a partícula, proporciona aproximação de vários receptores Fc, induzindo a dimerização. Esta união leva a fosforilação dos domínios ITAM pela ação de um membro de uma proteína chamada de *src*. A ITAM fosforilada permite a ativação de outra proteína (*Syk quinase*). Isso proporciona a transdução do sinal a vários outros caminhos sinalizatórios induzindo processos de transcrição, rearranjo de citoesqueleto, e liberação de mediadores pela célula que está fagocitando.

O envolvimento de ITAM, *src* e *Syk quinase* neste modelo são comprovados por vários experimentos com células transfectadas e com mutações pontuais nos domínios moleculares (Takai *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1993; Indik *et al.*, 1995; Greenberg, 1995). No entanto, vale ressaltar que este modelo só é válido para fagocitose via receptor Fc. Outros estudos necessitam ser realizados para o mecanismo de fagocitose seja mais bem compreendido. Sabe-se que existe o envolvimento de outras proteínas-chaves após a ativação de Syk, no entanto, ainda, nada é muito definitivo.

2) receptores *Toll* ((Tsuji *et al.*, 2000)

Estudos têm revelado a importância desses receptores por reconhecer produtos microbianos como lipopolissacarídeo presente na parede celular de bactérias Gram-negativas (Tsuji *et al.*, 2000). Após esse reconhecimento ocorre uma cascata de sinalização intracelular que resultará na translocação de fatores de transcrição nuclear (NF- κ B). Essa translocação resultará na tradução e ativação de diversas enzimas. Uma delas é a iNOS, que está envolvida na produção de óxido nítrico. Esse processo é um dos mecanismos de ação microbicida de macrófagos (Norris *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1996). Estudos demonstram que a ativação desse receptor também está envolvida na produção de citocinas como TNF- α , que estimula migração de células aos tecidos inflamados. (Banchereau e Steinman, 1998) e ativa macrófagos.

3) receptores para as proteínas do complemento. (Sengelov, 1995).

O receptor CR1 reconhece os fragmentos C3b, C4b e o iC3b e o CR3 (Mac-1 ou CD11b/CD18) reconhece o iC3b (Sengelov, 1995). Partículas opsonizadas por esses fragmentos de proteínas do complemento são reconhecidas pelos macrófagos. Estando o macrófago ativado, essas partículas são fagocitadas (Holers *et al.*, 1992). Este tipo de fagocitose constitui, provavelmente, o mecanismo de defesa mais utilizado pelos organismos contra a infecção sistêmica de bactérias e fungos.

4) receptores citocinas. (Auger & Ross, 1992).

As funções do macrófago são moduladas de acordo com alguns fatores. Um deles é o reconhecimento de citocinas através dos receptores. Como visto anteriormente, muitas delas atuam ativando ou desativando funções dos macrófagos (Auger & Ross, 1992).

5) receptores lectínicos. (Stahl *et al.*, 1998).

O receptor de manose (MR) foi o primeiro receptor da família dos receptores lectínicos a ter sua estrutura descrita. Esse receptor com peso molecular de 175kDa, apresenta na parte extracelular, um domínio rico em cisteína, um domínio contendo fibronectina tipo II, oito domínios de reconhecimento a carboidratos (CRD). Além disso, possui um domínio

transmembrana e uma pequena região intracelular (Pontow *et al.*, 1992; East & Isacke, 2002). Outros receptores como DEC 205, presente em células dendríticas com dez CRD; fosfolipase A2 e Endo 180 que contém oito CRD fazem parte dessa família (Taylor *et al.*, 2005). Estudos revelam a presença do MR principalmente em macrófagos. No entanto, esse receptor também é expresso por células do endotélio hepática, linfático, nas células dos rins, dos músculos lisos da traquéia e no epitélio da retina (Taylor *et al.*, 2005).

Diversas funções importantes são atribuídas aos sMR. Estudos sugerem que o MR tem papel importante na retirada de hidrolases lisossomais da circulação (Pontow *et al.*, 1992). Além disso, esse receptor está presente na reciclagem de compartimentos endocíticos, em subpopulações de macrófagos localizados em órgãos linfóides secundários e apresenta alta expressão em DC, sugerindo participar da captação de antígenos para apresentação imunológica (Taylor *et al.*, 2005). Através de seus domínios CRD, o MR reconhece manose, fucose e N-acetilglicosamina de uma maneira dependente de íons de Ca^{+2} . Essas moléculas estão presentes em muitos microorganismos. Dessa forma, o MR tem papel fundamental no processo de endocitose desses organismos (East & Isacke, 2002). Ademais, MR é citado como receptor importante na retirada de hormônios glicoprotéicos pelo fígado (Martinez-Pomares *et al.*, 2001) e no processo de imunidade humoral. Estudos revelam que o MR está presente no endotélio linfático aumentando a adesão dos linfócitos através de L-selectina. Essa interação pode ser importante para sua saída do linfonodo (Taylor *et al.*, 2005). Além disso, antígenos que contém carboidratos com afinidade para o MR são conduzidos aos centros germinativos dos linfonodos, contribuindo para a imunidade humoral (Martinez-Pomares, *et al.*, 1996; Martinez-Pomares & Gordon, 1999).

A expressão do MR pode ser modulada pela resposta imune. A resposta imune celular através da produção de IFN- γ inibe a expressão do receptor, enquanto que a resposta humoral estimula sua expressão através de citocinas como IL-10 e IL-4 (Taylor *et al.*, 2005; Pomares *et al.*, 1998; Pomares *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 1992). A expressão do MR na superfície é modulada por clivagem proteolítica do domínio extracelular, solubilizando a parte extracelular do MR. Estudos têm demonstrado que formas solúveis do receptor de manose (sMR) são encontradas em meio condicionado de macrófagos cultivados *in vitro* e no soro de camundongo. Essa liberação é estimulada e inibida por citocinas (Pomares *et. al* 1998). Além disso, têm sido mostrado que sMR é adsorvido na superfície de patógenos como *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* como forma de burlar o sistema de reconhecimento de macrófagos (Fraser *et al.*, 2000) e ainda que a infecção por *P. carinii* aumenta a produção de sMR nos fluidos pulmonares (Fraser *et. al*, 2000).

Outro receptor lectínico amplamente estudado é o sialoadesina (SD). Esse receptor está presente na superfície de macrófagos e tem afinidade para hemácias por apresentarem ácido siálico em sua superfície (Crocker e Gordon 1986). Estudos mostram que macrófagos presentes em infiltrados inflamatórios apresentam altos níveis de SD. Isso sugere que SD participa da interação célula-célula (Hartnel *et al.*, 2001; Dijkstra *et al.*, 1987; Noble *et al.*, 1990). Além disso, SD pode mediar a adesão de linfócitos T e B com MØs (Van den Berg *et al.*, 1992), já que macrófagos presentes no linfonodo apresentam alta expressão de SD (Nakamura *et al.*, 2002). Dessa forma fica claro que a participa da interação de macrófagos dos tecidos hematopoiéticos e linfóides, com outras células presentes nos tecidos. Além de ser influenciado por infecção de patógenos (Monteiro *et al.*, 2005).

4) Justificativa

A toxoplasmose é uma doença amplamente distribuída pelo mundo atingindo cerca de 50% da população mundial. Essa doença tem despertado grande interesse por ser uma das principais causas de óbito de embriões humanos e em pacientes portadores do vírus HIV. Dessa forma, diversos estudos têm sido realizados com objetivo de conhecer melhor o processo de interação do *T. gondii* com células hospedeiras. Os paradigmas atuais sobre a interação macrófago e *Toxoplasma gondii* têm revelado grande importância das secreções do parasita no desenvolvimento do seu ciclo de vida, envolvendo invasão, sobrevivência e multiplicação. Com isso, várias proteínas envolvidas nestes processos já foram descritas. No entanto, estudos moleculares mais detalhados, visando caracterizar, identificar e testar o efeito de outras proteínas do *T. gondii*, são necessários para elucidar o processo de interação do parasita com a célula hospedeira. De acordo com isso a tese visa investigar o efeito de meios condicionados, contendo secreções do *T. gondii*, na funcionalidade de macrófagos peritoneais de camundongos.

5) Objetivos

5.1) Objetivos gerais

Analisar os efeitos de meios condicionados por *Toxoplasma gondii* na funcionalidade de macrófagos peritoneais de camundongos

5.2) Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos cultivados com meio condicionado por *T. gondii*.
- Verificar a produção de óxido nítrico em macrófagos cultivados com meio condicionado por *T. gondii*.
- Caracterizar as proteínas do meio condicionado com efeitos sobre o macrófago.
- Identificar as proteínas do meio condicionado com efeitos sobre o macrófago.

6) Materiais e Métodos

6.1- Cultura de macrófagos

Camundongos suíço foram sacrificados em câmara de CO₂ e submetidos a lavagem peritoneal com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Trembicki *et al.*, 1984). Uma suspensão com 1×10^5 células foi semeada sobre lamínulas em placas de 24 poços. Após 1 hora de aderência a 37° C, atmosfera de 5% CO₂, as células foram lavadas e cultivadas por 24 horas em DMEM, meios condicionados por *T. gondii* ou sobrenadantes de lavados peritoneais de camundongos normais ou infectados suplementados com 10% de soro fetal bovino(SFB).

6.2- *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, cepa RH, foram mantidos por passagens na cavidade intraperitoneal de camundongos suíços. Após dois dias, o lavado peritoneal foi feito, centrifugado a 100 g por 5 minutos, para que resíduos celulares pudesse ser retirados. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000 g por 10 min. Dessa forma, o sobrenadante foi descartado e o parasita coletado (Silva *et al.*, 1982).

6.3 – Obtenção de meios condicionados por *T. gondii*

Para obter meios condicionados (CM), taquizoítos de *T. gondii* obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, foram cultivados em DMEM na concentração de 3×10^7 parasitas/ml. Diferentes CMs foram fabricados na qual o parasita foi:

- a) adicionado e imediatamente retirado do meio por centrifugação (0_{c1});
- b) lavado quatro vezes com PBS por centrifugação antes de sua adição ao meio (0_{c2});
- c) incubados por 10, 20, 30 minutos, 1, 6, 12, 24 horas.

Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 1000g, 10 minutos, 4°C, e utilizada diretamente na cultura de macrófagos ou após congelamento a -20 °C.

6.4- Obtenção de sobrenadante de lavado peritoneal de camundongo normal ou infectado por *T. gondii*

Lavado peritoneal foi realizado com meio DMEM em camundongos normais ou infectados por *T. gondii*. O sobrenadante do lavado de camundongo normal (SPWn) ou de camundongo infectado (SPWi) foi centrifugado à 1600g, 10min, e o sobrenadante foi coletado. Em alguns casos o SPWi foi encubado por 2-4h com altas concentrações de leveduras (10^{10} leveduras totais). Estas leveduras foram fervidas e lavadas 5 vezes com PBS. Elas serviram para remover do SPWi substâncias com afinidade para complexos moleculares das leveduras. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado quatro vezes à 1600g, 10min sendo denominado “SPWi tratado”. Os sobrenadantes foram usados no cultivo de macrófago e

analisado por eletroforese em mini géis com 8% de poliacrilamida contendo 0,1% sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE).

6.5 – Ativação dos macrófagos

Após terem sido cultivados por 24 e 48 horas em DMEM e MC 24h, os macrófagos foram ativados com interferon- γ (100U/ml) e lipopolissacarídeo (0,1 μ g/ml) por um período de 24 e 48 horas. Posteriormente à ativação, os sobrenadantes foram coletados e tiveram os níveis de NO avaliados.

6.5.1- Produção de Óxido Nítrico (NO)

O NO foi dosado indiretamente pela avaliação de nitrito como descrito por Green e cols. (1982). O volume coletado (50 μ l) foi misturado com volume igual do reagente de Griess (1:1, v/v de 0,1% de N-1-naftil-etilenediamida em água destilada e 1% de sulfanamida em 5% de ácido fosfórico) em placa de 96 poços. A absorbância a 540 nm foi medida após 10 min em leitor de ELISA. A concentração de nitrito foi calculada usando nitrato de sódio diluído em DMEM como padrão (Ding *et al.*, 1998).

6.6- Interação com Levedura

Macrófagos obtidos conforme item 6.1 foram cultivados com meio DMEM (controle), com os diferentes meios condicionados e sobrenadantes. Em alguns experimentos, o meio de cultura usado para o cultivo do macrófago foi acrescido de anti-TGF- β a 6 μ g/ml, um anticorpo de galinha (IgY) com efeito neutralizante. Após 24 horas de cultivo as células foram lavadas e colocadas por 1 hora em contato com leveduras autoclavadas (2 x 10⁶ leveduras/poço) por 15 minutos. Após a interação, as células foram lavadas, coradas com 0,1% azul de trypan em PBS, lavadas, fixadas com Bouin, desidratadas em serie acetona - xilou e montadas em lâminas com Entellan. As interações foram contadas em microscópio Axoplan equipado com contraste interferencial (DIC) discernindo as leveduras aderidas (coradas) das interiorizadas (não coradas) (Bos e DeSouza, 2000).

6.7 - Interação com hemácias

Hemácias humanas foram lavadas duas vezes com PBS e diluídas a 1% (v/v usando papa de hemácias) em meio DMEM. Após a diluição, as hemácias foram utilizadas ou opsonizadas com IgG. As hemácias foram colocadas para interagir com os macrófagos por 1 h a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂ numa concentração de 1 x 10⁶ células/ml. Nos experimento com hemácias opsonizadas, após a interação as células foram colocadas em contato com tampão de lise para remover as hemácias aderidas. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com PBS, e fixadas em metanol por 5 min ou montadas direto em 10 μ l de glutaraldeído a 1% em PBS.

6.8- Eletroforese SDS-PAGE de diferentes MC, SPW_n, SPWi e SPWi-tratado.

Meios condicionados por *T. gondii* e sobrenadantes obtidos como descrito nos itens 6.3 e 6.4 foram submetidos a SDS – PAGE 8% seguindo a descrição de Schagger e von Jagow em 1987. Em cada canal foram adicionados 50 µl de amostra. A eletroforese foi realizada a 50 volts contínuos por aproximadamente 5 horas. Posteriormente os géis foram corados com Comassie blue e analisados.

7) Resultados

O efeito do cultivo de macrófagos em meio condicionado por *T. gondii* (CM) na capacidade fagocítica de leveduras foi o primeiro experimento realizado. O CM aumenta a média de macrófagos com leveduras aderidas e diminui a média de leveduras interiorizadas por macrófagos cultivados por 24h e 48h (tabela-1). Esse efeito é verificado mesmo quando o CM é congelado antes de ser usado nas culturas de macrófagos (dados não mostrados).

Tabela-1. Efeito de meio condicionado por *Toxoplasma gondii* na fagocitose de levedura por macrófago peritoneal de camundongo^a

	24h		48h	
	DMEM	CM	DMEM	CM
% Mφ c/ lev ^b	94,8 ± 2,04 ^c	96 ± 1,91	96,5 ± 0,57	97 ± 1
Lev Int ^b	4,36 ± 0,95	2,71 ± 0,32 ^d	6,60 ± 1,27	3,49 ± 1,67 ^d
Lev Ader ^b	4,27 ± 0,59	6,78 ± 1,88 ^d	2,94 ± 0,79	7,39 ± 2,60 ^d

^a Macrófagos foram cultivados até 48 h na presença de meio condicionado por *T. gondii* (CM) ou meio controle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 e 48 hs de cultivo, foi realizada interação com leveduras.

^b % Mo c/ lev, porcentagem de macrófagos com leveduras; Lev Int, leveduras interiorizadas; Lev Ader, leveduras aderidas.

^c Resultados apresentados na forma de média e desvio padrão de n = 6.

^d Diferenças significativas relativa ao macrófago cultivado em DMEM, analisadas pelo teste *t* de Student ($P > 0,05$).

Tendo conhecimento deste fenômeno, procuramos verificar se a modulação da fagocitose estaria relacionada com mecanismo de desativação do macrófagos. Para tal, resolvemos avaliar a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativado com interferon γ (IFN) e lipopolissacarídeo (LPS), cultivados na presença de CM. O racional desta idéia se baseia no fato que o CM poderia alterar a ativação do macrófagos diminuindo a produção de NO já que o *T. gondii* inibe a produção deste radical após a interação com macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002).

De acordo a tabela-2, constatamos que o CM aumenta a produção de NO dos macrófagos. Isso é mais evidente em macrófagos cultivados por 48h (tabela-2).

Tabela-2. Efeito de meio condicionado por *Toxoplasma gondii* na produção de nitrito (óxido nítrico) por macrófagos peritoneal de murino^a

Ativação	Tempo de cultivo do macrófago			
	24h		48h	
	DMEM	CM	DMEM	CM
24 h	39,17 ± 26,35 ^b	40,3 ± 20,51	44,93 ± 36,38	55,52 ± 32,4
48 h	70,48 ± 38,96	77,22 ± 35,70	71,47 ± 30,19	86,24 ± 19,77

^a Macrófagos foram cultivados na presença de meio condicionado por *T. gondii* (CM) ou meio normal (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino. Após 24 e 48 h de cultivo, os macrófagos foram ativados com Interferon gama (100U/ml) e lipopolissacarídeo (0,1 µg/ml) e nitrito avaliado após 24 e 48 h.

^b Resultados apresentados na forma de média e desvio padrão de 6 experimentos em duplicata.

Tendo como base os dados da tabela 1, iniciamos estudos bioquímicos para melhor entender a natureza das proteínas secretadas pelo *T. gondii*, contidas no CM, verificar o momento exato de secreção da proteína modulatória e analisar suas características moleculares. Através da análise em SDS-PAGE 8%, verificamos que não existia diferença entre os perfis eletroforéticos das proteínas dos CMs obtidos em 1, 6, 12 e 24 h de cultivo do *T. gondii* em DMEM (figura-1).

A partir daí, passamos a analisar os CMs obtidos com tempos curtos (10, 20 e 30 min.); o meio de cultura puro e CM no qual o *T. gondii* foi colocado e retirado imediatamente por centrifugação (0_c). Verificamos que o perfil eletroforético era o mesmo para as diferentes amostras (figura-2).

A figura 2 mostra que as proteínas contidas no CM não são secretadas pelo *T. gondii*, já que o 0_c , CM no qual o parasita entrou em contato com o meio de cultura por poucos segundos, apresentou o mesmo perfil eletroforético do CM obtido após 30 minutos (figura-2).

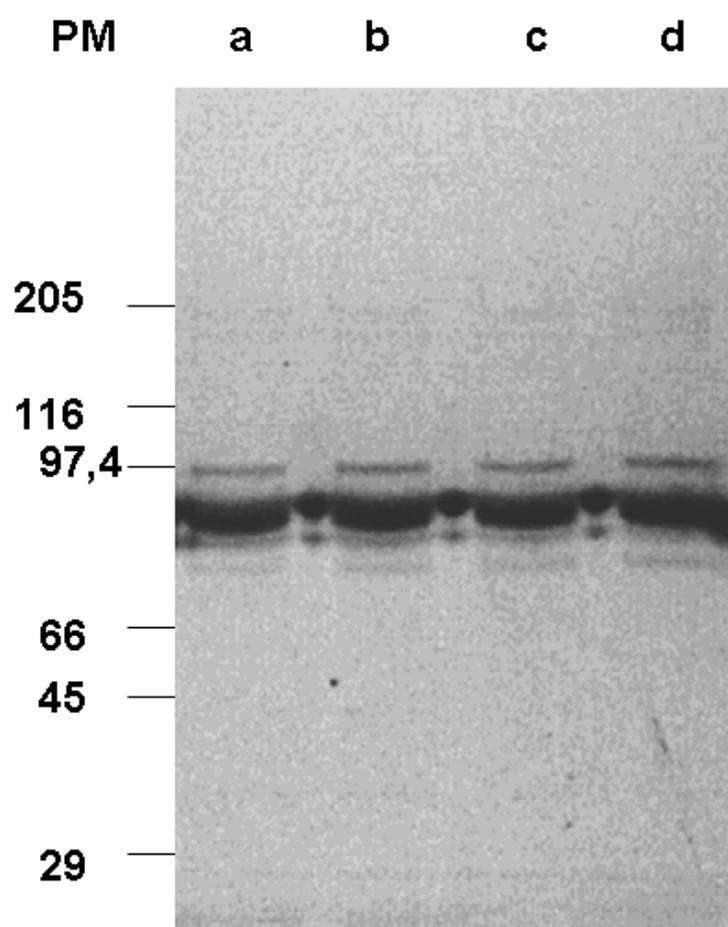


Figura 1. Gel de poliacrilamida (8%) com SDS, no qual foram colocados 50 μ l das seguintes amostras de meio condicionado: 1 (a), 6 (b), 12 (c), 24 (d) horas.

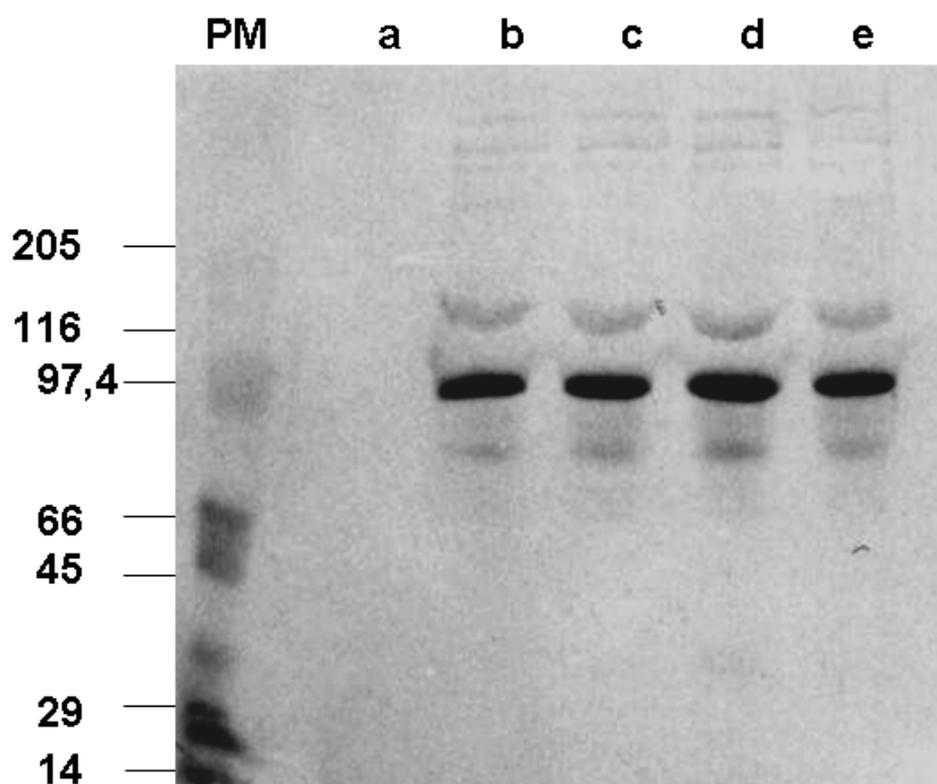


Figura 2. Gel de poliacrilamida (8%) com SDS, onde foram colocados 50 μ l de Meio de cultura puro (a) e Meios Condicionados onde o *T. gondii* foi colocado e retirado imediatamente (b), após 10 (c), 20 (d) e 30 (e) min.

Não sendo conteúdo liberado pelo parasita, nosso próximo passo foi verificar se as proteínas modulatórias presentes no CM eram da superfície do parasita ou eram próprias do peritônio inflamado do camundongo. Sendo assim o *T. gondii* foi extensivamente lavado por centrifugações repetitivas (até 4 vezes) antes de produzir o CM. Desta forma obteve-se CM de parasita lavado ($0_{c/2}$). Também foi analisado o sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo normal (SPWn) e de camundongo infectado por *T. gondii* (SPWi).

Os resultados mostram claramente que o perfil eletroforético dos diferentes CM são similares. No entanto, a diferença entre eles está na concentração das proteínas. $0_{c/2}$ apresenta concentração mínima de proteínas, enquanto a maior concentração é notada no SPWi (figura-3).

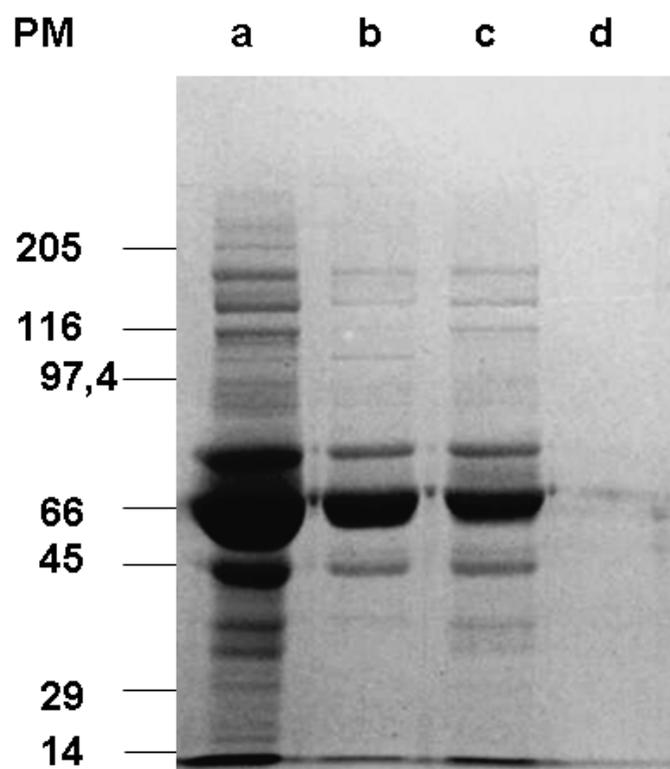


Figura 3. Gel de poliacrilamida (8%) com SDS, onde foram colocados 25 μ l do sobrenadante de peritônio de camundongo infectado (a) e de camundongo normal (b); Meio Condicionado onde o *T.gondii* foi colocado e retirado imediatamente (c) e Meio Condicionado onde o *T.gondii* foi lavado extensivamente por centrifugação (d).

Tendo como base os resultados mostrados anteriormente, resolvemos testar biologicamente a fagocitose dos macrófagos cultivados com cada um dos diferentes CM e sobrenadantes que foram analisados eletroforicamente. Experimentos foram realizados no intuito de comprovar a suspeita de que proteínas do próprio camundongo inibiam a fagocitose de leveduras por macrófago. Verificamos que os dois CMs e os dois sobrenadantes inibem a atividade fagocítica dos macrófagos (tabela-3). Além disso, os resultados mostraram também que o SPWi teve maior efeito inibitório de interiorização de leveduras nos macrófagos, seguidos do SPWn, CM 24h e 0_c. O efeito inibitório da fagocitose por proteínas presentes no SPWi foi tão significativa que pode ser constatada qualitativamente (figura 4), na qual se percebe maior quantidade de leveduras aderidas (coradas) se comparado ao controle.

Tabela 3. Efeito de diferentes meios condicionados por *Toxoplasma gondii* e Sobrenadante de lavado peritoneal de animal normal (SPWn) ou infectado (SPWi) por este parasita na fagocitose de leveduras por macrófago peritoneal de murino^a.

	DMEM	SPWi	SPWn	Meio 0 _c	Meio 24 h
% Mφ c. Lev ^b	90% ± 6,94 ^c	89% ± 1,66	89% ± 0,89	89% ± 0,82	89% ± 0,50
Lev. Int. ^b	4,82 ± 0,39	1,35 ± 0,26	1,61 ± 0,25	1,94 ± 0,11	1,76 ± 0,28
Lev Ader. ^b	2,22 ± 0,68	3,27 ± 0,49	2,67 ± 0,34	3,30 ± 0,29	2,72 ± 0,30

^a Macrófagos foram cultivados na presença de meio condicionado por *T. gondii* (Meio 0_c, *T. gondii* foi adicionado e meio imediatamente centrifugado; Meio 24 h, *T. gondii* foi adicionado, cultivado por 24 horas e meio centrifugado), lavado de animal normal ou infectado ou meio normal (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino. Após 24h foram realizadas interações com leveduras.

^b % Mo c/ lev, porcentagem de macrófagos com leveduras; Lev Int, leveduras interiorizadas; Lev Ader, leveduras aderidas.

^c Resultados apresentados na forma de média e desvio padrão de n = 6.

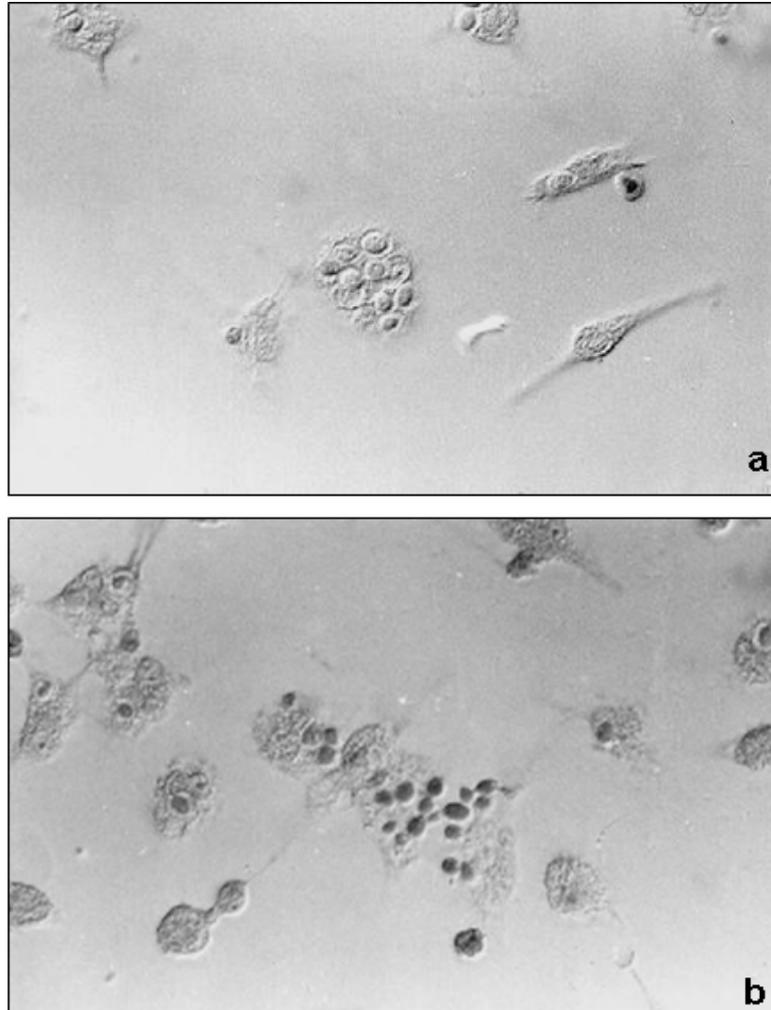


Figura 4. Interação de leveduras com macrófagos cultivados por 24h com DMEM (a) e sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado por *T. gondii* (b) ambos suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Note a grande quantidade de leveduras coradas (aderidas) na foto *b*.

Sabendo que a fagocitose de leveduras por macrófagos foi inibida na presença de proteínas advindas do peritônio e presente nos CMs e nos SPWs, resolvemos verificar se essa modulação estava restrita à via do receptor de manose. Para tal, realizamos interações de macrófagos com hemácias opsonizadas, para constatar se o efeito inibitório das proteínas do SPWi poderia se estender à fagocitose via receptor Fc de imunoglobulinas. Nossos resultados demonstraram que SPWi aumentou levemente a porcentagem de macrófagos contendo hemácias opsonizadas (tabela-4).

Tabela 4- Efeito de sobrenadante do lavado peritoneal (SPWi) de camundongo na fagocitose por macrófagos de hemácia opsonizada com anti-hemácia humana^a.

	DMEM Sem tampão de lise	SPWi	DMEM com tampão de lise	SPWi
% Mφ c/ hem ^b	89 ± 2,71 ^c	92 ± 1,53	76 ± 4,16	88 ± 1
Hem / Mφ ^b	10,08 ± 0,94	14,36 ± 0,83	4,2 ± 0,35	4,95 ± 0,34

^a Macrófagos foram cultivados em sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado ou DMEM normal. Após 24 h de cultivo, interações com hemácias opsonizadas foram realizadas, em metade dois poços as células foram tratadas com tampão de lise e a fagocitose avaliada.

^b % Mφ c/ hem, porcentagem de macrófagos com hemácias; Hem / Mφ número de hemácias por macrófagos

^c Resultado apresentado em forma de média e desvio padrão (n=3).

Estes experimentos mostraram que não houve uma alteração significativa na fagocitose de hemácias por macrófagos (ver *com tampão de lise*). No entanto, pudemos notar uma maior adesão das hemácias aos macrófagos (ver *sem tampão de lise*). Para investigar esse fenômeno de adesão, resolvemos verificar a expressão de sialoadesina na superfície de macrófagos cultivados com SPWi, realizando interações com hemácias não-opsonizadas. A sialoadesina é um receptor de macrófagos que é expresso em macrófagos cultivados com soro de camundongo (Monteiro *et al.*, 2005). Os experimentos mostraram que o SPWi aumenta a quantidade de hemácias não-opsonizadas aderidas aos macrófagos e a porcentagem de macrófagos com hemácias, indicando aumento na expressão de sialoadesina (tabela 5), receptor que reconhece ácido siálico na superfície das hemácias, descrito como um receptor não fagocítico.

Tabela 5. Expressão de sialoadesina em macrófagos cultivados com SPWi^a.

	DMEM	SPWi
% Mφ c/ hem ^b	15,5% ± 6,36 ^c	73,2 % ± 5,87
Hem/ Mφ ^b	1,45 ± 0,21	6,00 ± 0,95

^a Macrófagos foram cultivados por 24 h na presença de SPWi e meio controle (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino. Após este período, foram feitas interações com hemácias puras.

^b % Mφ c/ hem, porcentagem de macrófagos com hemácias; Hem / Mφ, número de hemácias por macrófagos.

^c Resultados apresentados na forma de média e desvio padrão.

Estudos têm demonstrado que formas solúveis do receptor de manose (sMR) são encontradas em meio condicionado de macrófagos cultivados *in vitro* e no soro de camundongo (Pomares *et. al* 1998). Dessa forma, resolvemos verificar se o SPWi possui essa proteína solúvel, pois poderia estar se adsorvendo na superfície do macrófago modulando a fagocitose de leveduras diminuindo a eficiência de interiorização. Para isso, colocamos o SPWi em contato com grande quantidade de leveduras (SPWi-tratado). Dessa forma, o sMR seria retirado do meio por se ligar à manose na superfície das leveduras. Após este tratamento, analisamos o SPWi-tratado em SDS-PAGE. Os resultados demonstraram que houve uma alteração significativa do perfil eletroforético do SPWi após o tratamento com leveduras (figura-5). Constatamos que uma proteína com peso molecular de aproximadamente 140 kDa tem sua concentração reduzida se comparado ao SPWi-normal. O densidograma do gel mostra claramente essa redução. No entanto outras proteínas, com menor peso molecular também desaparecem do gel após o tratamento do SPWi com leveduras (figura 6).

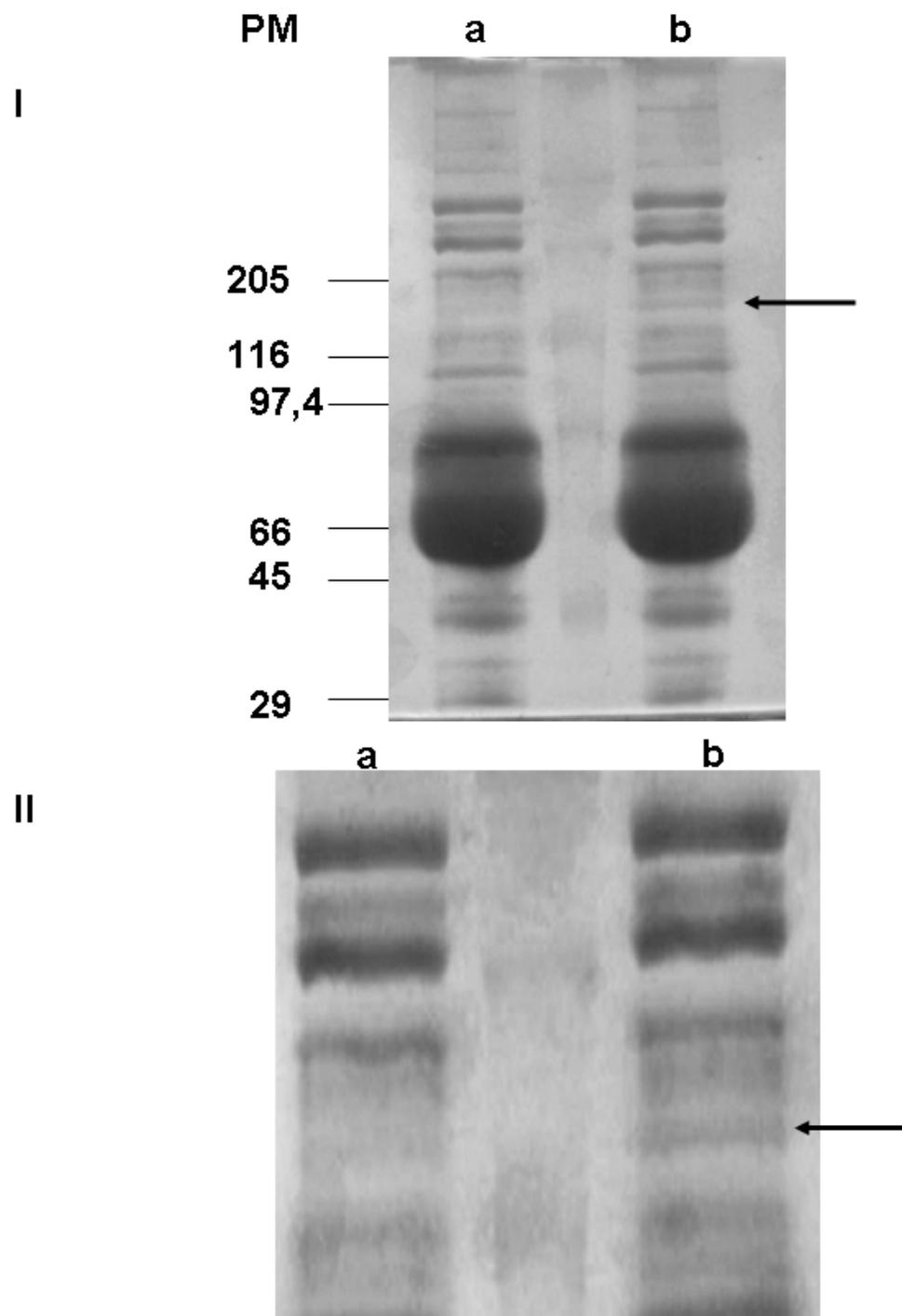


Figura 5- Gel de poliacrilamida (8%) com SDS, onde foram colocados 50 μ l do sobrenadante de peritônio de camundongo infectado tratado (a) e não tratado com leveduras (b). I- O tratamento com levedura diminui a concentração de uma das bandas na sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado por *T. gondii* (seta). II- Ampliação da região do gel onde ocorreu redução da proteína.

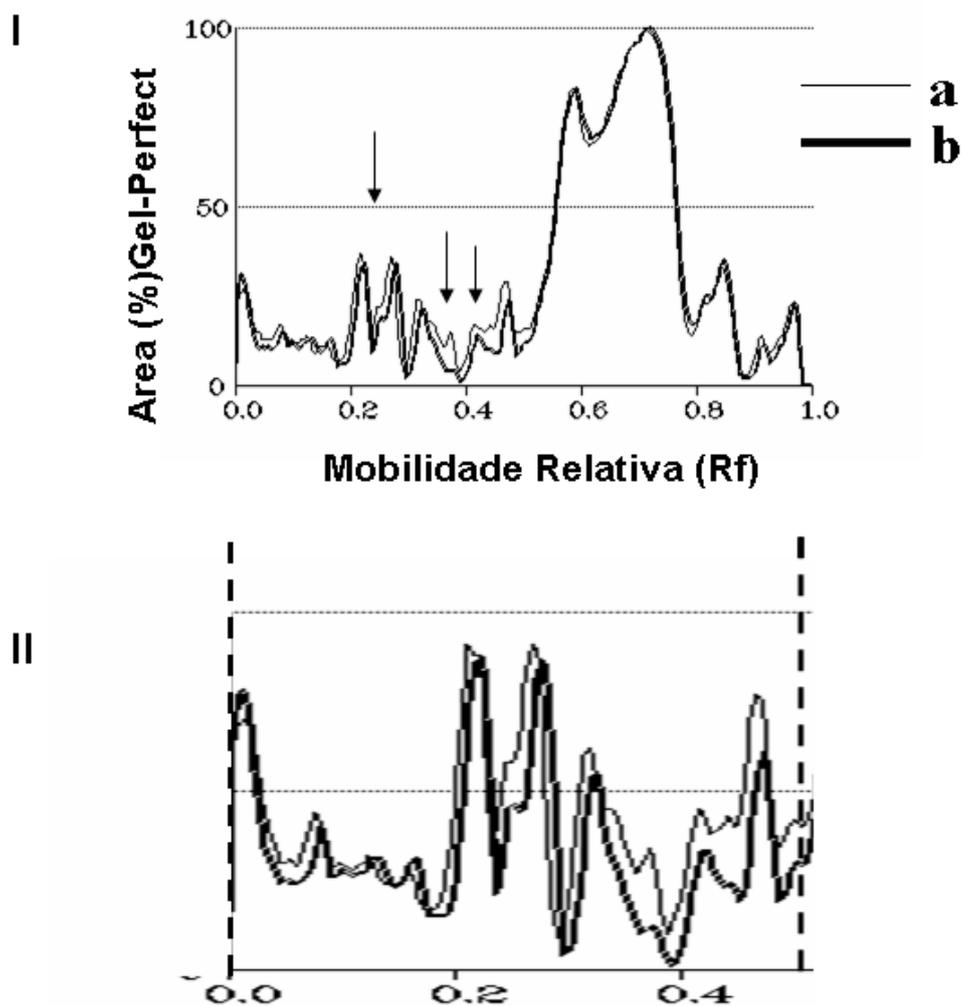


Figura 6- Densitograma de gel SDS-PAGE 8% de poliacrilamida com SDS, com sobrenadante de peritônio de camundongo infectado não tratado (a) e tratado com leveduras (b). I - Note que o tratamento induz a uma redução de proteínas, ilustradas em três pontos do gráfico (seta); II- Ampliação dos pontos do gráfico onde houve redução.

Com base nestes dados, resolvemos verificar se o macrófago cultivado com SPWi-tratado apresentava redução na atividade fagocítica para leveduras. Para isso, utilizamos este sobrenadante nas culturas de macrófagos e avaliamos a fagocitose de leveduras (Tabela 6).

Tabela 6- Interação de leveduras com macrófagos cultivados na presença de sobrenadante do lavado peritoneal de camundongos infectados por *T. gondii* antes (SPW-inf. normal) e após tratamento com leveduras (SPW-inf. Tratado).^a

	DMEM	SPW-inf. Normal	SPW-inf. Tratado.
% Mφ c/ Lev ^b .	83% ± 1,73 ^c	85% ± 4,3	91% ± 1,15
Lev. Int. ^b	2,95 ± 0,37	1,93 ± 0,3	3,3 ± 0,61
Lev. Ader. ^b	2,4 ± 0,58	3,10 ± 1,08	1,94 ± 0,47

^a Macrófagos foram cultivados por 24 h na presença de SPW-Inf. Normal, SPW-Inf. Tratado e meio controle (DMEM), suplementado com 10% soro fetal bovino. Após 1h, foram feitas interações com leveduras.

^b % Mo c/ lev, porcentagem de macrófagos com leveduras; Lev Int, leveduras interiorizadas; Lev Ader, leveduras aderidas.

^c Resultados apresentados na forma de média e desvio padrão.

Os dados mostraram que os macrófagos cultivados com SPWi-normal apresentam uma redução na interiorização e um aumento na adesão de leveduras como já verificado em outros experimentos (Tabela 3). No entanto, em macrófagos cultivados com o SPWi-Tratado a fagocitose não apresenta alteração significativa. Estes dados indicam que a substância contida no SPWi, que tem efeito modulatório na fagocitose por macrófagos, possui afinidade por componentes da superfície de leveduras, provavelmente manose.

Estudos mostram que a expressão e a liberação do receptor de manose são suprimidas e aumentadas, respectivamente, por citocinas produzidas pela resposta imune celular e humoral (Taylor *et al.*, 2005; Pomares *et al.*, 1998; Pomares *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 1992). De acordo com isso, resolvemos verificar a presença de TGF-β no SPWi, já que é uma citocina produzida na resposta humoral. Para tal, macrófagos foram cultivados em SPWi e DMEM, na presença ou ausência de neutralizante anti-TGF-β e analisada a capacidade fagocítica para leveduras. Através dos resultados obtidos (tabela-7), notamos que o uso do neutralizante não alterou o efeito do SPWi na fagocitose. No entanto, podemos verificar que houve aumento no número médio de leveduras interiorizadas nos macrófagos cultivados com DMEM (tabela-7). Este resultado pode ser explicado devido a presença de TGF-β no soro fetal bovino.

Tabela 7. Interação de leveduras com mØ cultivados na presença de anti-TGF- β .^a

	Sem anti-TGF- β		Com anti-TGF- β	
	DMEM	SPWi	DMEM	SPWi
% M ϕ c/ lev. ^b	85% \pm 2 ^c	83 % \pm 0,58	83% \pm 1,53	78% \pm 3
Lev. Int. ^b	2,16 \pm 0,15	1,82 \pm 0,44	2,45 \pm 0,24	1,56 \pm 0,14
Lev. Ader. ^b	2,07 \pm 0,15	2,34 \pm 0,73	1,74 \pm 0,33	2,15 \pm 0,33

^a Macrófagos foram cultivados por 24 h na presença de SPWi e meio controle (DMEM), na presença e na ausência de anti- TGF- β , suplementado com 10% soro fetal bovino. Após este período, foram feitas interações com leveduras.

^b % Mo c/ lev, porcentagem de macrófagos com leveduras; Lev Int, leveduras interiorizadas; Lev Ader, leveduras aderidas.

^c Resultados apresentados na forma de média e desvio padrão.

8) Discussão

No intuito de se melhor compreender como proteínas secretadas pelo *Toxoplasma gondii* conseguem modular macrófagos, realizamos experimentos nos quais macrófagos foram cultivados em meios condicionados obtidos com o parasita. Inicialmente nossos resultados mostraram que proteínas secretadas pelo *T. gondii*, portanto presente nos CMs, modularam a funcionalidade dos macrófagos, diminuindo a interiorização de levedura e conseqüentemente aumentando leveduras aderidas (tabela 1). Assim, mesmo sem ter contato direto, o parasita conseguiu modular a funcionalidade da célula hospedeira. Dessa maneira, seria coerente que essas mesmas proteínas diminuíssem a produção de NO, pois é descrito que o *T. gondii* tem a capacidade de inibir esse processo de produção para burlar o sistema microbicida do hospedeiro (Seabra *et al.*, 2002). Contudo, nossos resultados, mostraram que os macrófagos cultivados com CM apresentaram maior produção de NO (tabela 2). Descartando, desse modo, a possibilidade da modulação da fagocitose ocorrer devido a uma desativação dos macrófagos coincidente com a via de ativação de NO.

Os estudos bioquímicos realizados com o intuito de conhecer o momento exato e caracterizar as proteínas secretadas pelo *T. gondii* mostraram que o meio de cultura utilizado na confecção dos CMs não influenciava no perfil das proteínas, o CM 24h e o CM em que o parasita ficou durante um mínimo tempo de cultivo no meio de cultura (0c/) apresentavam perfis similares (figura 1 e 2). Estes resultados descartaram nossa hipótese de que as proteínas que inibem a atividade fagocítica de leveduras pelos macrófagos fossem secretadas pelo parasita. No entanto, nos levaram a crer que as proteínas estariam adsorvidas na superfície do *T. gondii* ou seriam pertencentes ao peritônio do próprio camundongo no qual foi obtido o parasita. Essa hipótese foi confirmada através dos estudos do CM em que o parasita foi lavado antes de ser utilizado para a obtenção do meio dos sobrenadantes, e do lavado peritoneal de camundongos normais (SPWn) e infectados (SPWi) que mostraram que as proteínas contidas no CM são provenientes do peritônio do camundongo (figura 3). Essas proteínas são trazidas para o CM já que estão adsorvidas nos parasitas. Estes resultados mostraram que o *T. gondii* obtido de peritônio infectado apresentava-se recoberto por camada de proteínas do camundongo. Isto sugere que o parasita utiliza estas proteínas como forma de burlar o sistema imunológico do animal, já que este sistema não reconhece proteínas do próprio organismo. Estas proteínas estariam parcialmente camuflando o parasita do reconhecimento imunológico. Estudos, utilizando *T. gondii* obtidos de cultura de fibroblastos, seriam necessários para comparar o efeito sobre a funcionalidade de macrófagos. Já que esses parasitas não teriam proteínas do peritônio adsorvidas em sua superfície. Além disso, esses

estudos seriam importantes, pois é descrito que *T. gondii* tem a capacidade de secretar proteínas *in vitro*. Uma delas é a ciclofilina 18 que estimula a produção de IL-12 em DC (Aliberti *et al.*, 2003). Mas qual será o efeito dessa proteína na fagocitose de partículas por macrófagos?

Percebemos então que o parasita, mesmo sem ter contato direto, consegue modular a célula hospedeira através de seus produtos secretados (Aliberti *et al.*, 2003). Daí a importância do estudo de CM sobre as diversas funções das células, como por exemplo, o macrófago. Porém nossos dados revelaram que proteínas próprias do camundongo também têm a capacidade de modular a fagocitose de leveduras por macrófagos, inibindo a interiorização e aumentando a adesão. Esse efeito fica mais evidente em camundongo infectado por *T. gondii* (Tabela 3). Interessante notar que o efeito biológico sobre a fagocitose (tabela 3) é diretamente proporcional à concentração de proteínas na seqüência CM 0c/, CM 24h, SPWn e SPWi (figura 3).

Monócitos e macrófagos são responsáveis pela produção de citocinas pro-inflamatórias, mas podem também produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (Mosser e Kqarp, 1999). Estas moléculas são elementos chave nos mecanismos de regulação negativa da atividade induzida por citocinas pro-inflamatórias. A produção em grandes quantidades das monocinas anti-inflamatórias está freqüentemente associada com aumento da susceptibilidade à infecção intracelular (Mosser e Karp, 1999). Sabe-se que microorganismos de todos os Filos são conhecidos por induzir a produção de monocinas que induzem tanto atividades pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (Mosser e Kqarp, 1999). TGF- β vem sendo reconhecido como um importante imunoregulador que é induzido como mecanismo de escape por parasitos (Letterio e Roberts, 1998). Além disso, é descrito que o *T. gondii* estimula a produção de TGF- β através da fosfatidilserina exposta em sua superfície (Seabra *et al.*, 2004). Dessa maneira poderia esperar que o TGF- β , presente no SPWi pudesse estar desativando os macrófagos modulando sua capacidade fagocítica. Porém nossos dados mostraram que o uso de neutralizante anti TGF- β IgY não alterou a modulação do SPWi sobre os macrófagos. Além disso, notamos que o congelamento e descongelamento do CM não alterou a capacidade de modular os macrófagos (dados não mostrados). Assim, descartamos a possibilidade da modulação da fagocitose ter acontecido via citocinas, pois essas perdem sua função após congelamento. Dessa maneira, que fenômeno poderia estar ocorrendo no peritônio do camundongo em que a infecção por *T. gondii* levaria a uma maior produção e proteínas modulatórias sobre a fagocitose de macrófagos?

Diversos estudos têm demonstrado que o receptor de manose (MR), presente em macrófagos, sofre clivagem proteolítica em seu domínio extracelular tornando-se solúvel no meio. Ademais, formas solúveis do receptor de manose (sMR) são encontradas em meio condicionado de macrófagos cultivados *in vitro* e no soro de camundongo (Pomares *et al.*, 1998). Dessa maneira percebemos que a proteína que estaria modulando a fagocitose de leveduras por macrófago poderia ser o sMR. Esse receptor vindo do peritônio estaria se adsorvendo na superfície dos macrófagos durante o cultivo. Com isso, as leveduras seriam reconhecidas pelo domínio CRD do receptor, porém não desencadearia um processo sinalizatório devido à ausência do domínio intracelular. Assim ocorreria um aumento no número de leveduras aderidas e uma redução nas leveduras interiorizadas, devido à competição do receptor funcional com o receptor solúvel adsorvido ao macrófago. Esse fato é coerente com os nossos resultados mostrados na tabela 1 e 3 na qual o cultivo de macrófagos com CMs e SPWs leva a uma redução na interiorização e aumento na adesão. Além disso, estudos sugerem que alguns patógenos como *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* conseguem burlar o reconhecimento de macrófagos através da adsorção de sMR em sua superfície (Fraser *et al.*, 2000). O que reforça o provável uso pelo *T. gondii* deste mesmo receptor solúvel. Nossos dados mostraram que a proteína, com efeito modulatório, presente nos CMs e no SPWs se adsorve na superfície do *T. gondii*, diminuindo sua concentração quando esse parasita é lavado exaustivamente por centrifugação (figura 3). Outro fato importante é que a produção do sMR aumenta nos fluidos pulmonares quando o indivíduo é infectado por *P. carinii* (Fraser *et al.*, 2000). Nossos dados mostraram que camundongos normais possuem a proteína modulatória sobre macrófagos em seu peritônio (figura 3). Porém quando infectados por *T. gondii* apresentam um aumento na concentração (figura 3) e conseqüentemente na inibição da fagocitose (tabela 3). Isto sugere que a infecção do *T. gondii*, induz a secreção do sMR como outros patógenos.

A hipótese do sMR ser a proteína inibitória ficou mais evidente após o tratamento do SPWi com altas concentrações de leveduras. Nossos resultados demonstraram que após o tratamento, uma proteína de aproximadamente 140kDa diminuiu a sua concentração no SPWi pois ficou adsorvida às leveduras (figura 5). Além disso, o SPWi perde seu efeito modulador sobre os macrófagos após esse tratamento (tabela 6). Esses dados indicaram que a proteína tem afinidade para componentes da superfície de leveduras, provavelmente manose por ser mais abundante. No entanto seriam necessários experimentos eluindo a proteína da superfície das leveduras e analisando-as para sua identificação. Mesmo assim, esses dados sugerem fortemente que os macrófagos estavam sendo modulados pelo sMR, já que é descrito que o

sMR perde seu domínio intracelular e hidrofóbico. Diminuindo, dessa forma, seu peso molecular.

Todos esses dados reforçam a idéia de que o sMR é a proteína modulatória sobre a fagocitose de leveduras por macrófagos. Isso explica o fato do tratamento dos macrófagos com SPWi não alterar a fagocitose de hemácias opsonizadas (tabela 4 *ver com tampão de lise*). No entanto, nossos resultados mostraram um aumento na adesão de hemácias aos macrófagos (*ver sem tampão de lise*). Porém essa adesão não está relacionada somente ao receptor Fc. Os resultados contidos na tabela 5 revelaram que componentes do SPWi aumentam a expressão do receptor sialoadesina na superfície de macrófagos, descrito como um receptor não fagocítico (Crocker *et al.*, 1991). Constata-se, no entanto, que a maior adesão se dá através de ambos os receptores, Fc e sialoadesina, pois é descrito que a interação entre a partícula e a superfície do macrófago não ocorre por um receptor isoladamente, mas por múltiplos receptores simultaneamente (Underhill & Ozinsky, 2002). Logo, seria necessário interagir os macrófagos com hemácias dessializadas e opsonizadas por IgG para observarmos somente o efeito do SPWi na interação de hemácias somente via receptor Fc. Chamamos atenção aqui do uso do CM como outra forma de induzir a expressão de sialoadesina além do já descrito uso de soro homólogo. Isto abre outra possibilidade de projeto de pesquisa dentro da linha da “biologia de macrófagos” que o grupo realiza.

Com base nos nossos dados sugerimos nesse trabalho que os camundongos infectados com a cepa RH e utilizados para a obtenção do SPWi apresentava resposta imune humoral. Dessa forma, as citocinas produzidas nessa resposta aumentaram a expressão do MR na superfície dos macrófagos e conseqüentemente sua liberação (Taylor *et al.*, 2005; Pomares *et al.*, 1998; Pomares *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 1992). Isso fez com que os fluidos peritoneais apresentassem grande quantidade do sMR. Assim quando o lavado peritoneal era realizado, o sMR era coletado. Essa idéia é reforçada pelo fato do SPWi apresentar maior concentração da proteína modulatória se comparado ao SPWn. Além disso, percebemos que quando o *T. gondii* foi lavado exaustivamente por centrifugação, a concentração da proteína diminuiu. Provavelmente por estar adsorvida na superfície do parasita e devido à troca de meios após cada lavagem. Sabe-se que investigações mais detalhadas são necessárias para confirmar se é realmente o sMR a proteína analisada nos nossos SPWs. No entanto, nossos resultados são fortes evidências de que o MR é modulado pela infecção por *T. gondii*, tal como outros patógenos como *P. carinii* e *C. albicans* para burlar o sistema microbicida do hospedeira (Fraser *et al.*, 2000).

Assim, nosso trabalho demonstrou a influência do *T. gondii* sobre a modulação da fagocitose de leveduras por macrófagos. Percebemos que a retirada do MR da membrana e sua adsorção na membrana do parasita, pode ser um outro mecanismo de evasão do parasita. Porém não podemos descartar que meios condicionados por *T. gondii* podem apresentar substâncias com capacidade de modulação sobre macrófagos.

9) Conclusões

- Meios condicionados e sobrenadantes do lavado peritoneal de camundongo normais e infectados por *Toxoplasma gondii* alteram a fagocitose de leveduras por macrófagos murinos, diminuindo a interiorização e aumentando a adesão.
- Proteínas que modulam a fagocitose de leveduras por macrófagos são próprias da cavidade peritoneal do camundongo e aumentam sua concentração quando a cavidade é infectada pelo *T. gondii*.
- Proteínas do peritônio de camundongo infectado com *T. gondii* ficam adsorvidas em sua superfície, podendo funcionar como um mecanismo de escape do parasita.
- A modulação da fagocitose nos macrófagos não é determinada pela presença de TGF- β no sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado por *T. gondii*.
- Proteínas presente no sobrenadante do lavado peritoneal de camundongo infectado com *T. gondii* não alteram a fagocitose de hemácias opsonizadas, porém aumenta a expressão de sialoadesina nos macrófagos.
- Proteínas da cavidade peritoneal que modulam a fagocitose de macrófagos tem afinidade por componentes da superfície de leveduras.
- A infecção pelo *T. gondii* pode induzir a clivagem proteolítica do receptor de manose, aumentando a concentração desse receptor solúvel na cavidade peritoneal.

10) Referências Bibliográficas

- Adams, D.O.; Hamilton, T.A. - The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 283-318, 1984.
- Adams, D.O.; Hamilton, T.A.. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: *The Macrophage*. (C.E. Lewis and J.O'D. McGee, eds) IRL Press, New York, NY. 75-114, 1992.
- Adams, L.B.; Hibbs, J.B.; Jr., Taintor, R.R.; Krahenbuhl, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii* Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 2725-2729, 1990.
- Adler, H.; Frech, B.; Thöny, M.; Pfister, H.; Peterhans, E; Jungi, T.W. Inducible Nitric Oxide Synthase in Cattle - Differential Cytokine Regulation of Nitric Oxide Synthase in Bovine and Murine Macrophages. *J. Immunol.* 154:4710-4718, 1995.
- Ahmed N, Rice GE. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 815:39-50, 2005.
- Alibert, J. Host persistence: Exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol.* 5:162-170, 2005
- Aliberti, J.; Valenzuela, J.G.; Carruthers, V.B.; Hieny, S.; Andersen, J.; Charest, H.; Reise Sousa, C.; Fairlamb, A.; Ribeiro, J.M.; Sher, A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nature Immunology* 4:485-490, 2003.
- Araujo-Jorge T.C.; De Souza W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Trop.*, 45:127-36, 1988.
- Assreuy, J.; Cunha, F.Q.; Epperlein, M.; Noronha-Dutra, A.; O'Donnell, C.A., Liew, F.Y.; Moncada, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* 24: 672-676, 1994.
- Auger, M.J.; Ross, J.A. The biology of the macrophage. In *The Macrophage*. (C.E. Lewis and J.O'D. McGee, eds) IRL Press, New York, NY. 1-74, 1992.
- Badwey, J.A.; Karnovsky, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 695-726, 1980.
- Banchereau, J.; Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252, 1998.
- Barragan A.; Brossier, F.; Sibley, L.D. Transcellular of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) with the parasite adhesion MIC2. *Cell Microbiol.* 7:561-568. 2005
- Beckers C.J., Dubremetz J.F. Mercereau-Puijalon O., Joiner K.A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127:947-961, 1994.
- Blackman, M.J., Bannister, L.H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Bioch. Parasitol.* 117:11-25, 2001.
- Bos, H., de Souza, W. Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *J. Immunol. Methods*, 2000 in press.
- Bouchot A, Zierold K, Bonhomme A, Kilian L, Belloni A, Balossier G, Pinon JM, Bonhomme P. Tachyzoite calcium changes during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.*; 85(10):809-18, 1999.
- Brossier, F.; Sibley L.D. *Toxoplasma gondii*: Microneme protein MIC2. *Int. J. Bioch.*, 37: 2266-2272, 2005.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol.* 1:225-35; 1999.
- Carruthers VB, Moreno SN, Sibley LD. Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca²⁺] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J.*;342 (Pt 2):379-86; 1999.
- Carruthers VB, Sherman GD, Sibley LD. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem.* 275:14346-53; 2000.
- Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.*;31(2):421-8; 1999.

- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 73:114-23; 1997.
- Carruthers, V.B.; Hakansson, S.; Giddings, O.K. e Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Inf. Immun.*, 68:4005-4011, 2000.
- Carvalho, T.U.; Souto-Padron, T.; De Souza, W. Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 77:156-161, 1991.
- Cerede O.; Dubremetz, J.F.; Soète, M.; Deslée, D.; Vial, H.; Bout, D.; Lebrun, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 201:453-463, 2005
- Cesbron-Delauw, M.F.. Molecular Characterization of a 23-Kilodalton K major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7537-7541, 1989.
- Chesrown, S.E., Monnier, J., Visner, G., Nick, H.S. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF-g, TGF-b, and IL-10 in murine macrophages cell lines and rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Com.* 200: 126-134, 1994.
- Conner, S. D. e Schmid, L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature Publishing Group* 422:37-44, 2003.
- Coppense, I., Andries, M., Liu, J.L., Cesbron-Delauw, M. Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for regulated exocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 463-472, 1999.
- Crocker, P.R., Gordon, S. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J. Exp. Med.* 164:1862-1875, 1986.
- Crocker, P.R., Kelm, S., Dubois, C., Martin, B., McWilliam, A.S., Shotton, D.M., Paulson, J.C., Gordon, S. Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *EMBO J.*, 10:1661-1669, 1991.
- Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimaraes U Jr, Arnholdt AC. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 6:1287-1296, 2004.
- De Souza, W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *Annals of the Brazilian Academy of Science.* 78:271-291, 2006.
- Devada, K., Anandan, R., Dubey, J.P. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, India. *J Parasitol.*, 84(3):621-2, 1998.
- Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Rollinghoff M, Gresser I, Bogdan C. Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8:77-87, 1998.
- Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412, 1988.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2412, 1998.
- Dobrowolski J.M., Carruthers V.B., Sibley L.D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 1997 Oct;26(1):163-73.
- Dobrowolski J.M., Sibley L.D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 84:933-9, 1996.
- Dowse T.; Soldati D. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol.* 7:388-96. 2004.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 28:1019-24, 1998.
- East, L.; Isacke, C.M.. The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 1572:364-86, 2002
- Frenkel J.K. Biology of *Toxoplasma gondii*. In Aambroise-Thomas P, Peterse E, (eds), *Congenital Toxoplasmosis, Scientific Background, clinical management and control*, p.9-25. Paris, Springer-Verlag.
- Furtado GC, Cao Y, Joiner KA. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun.* 60:4925-31, 1992.
- Germain, R.N. & Margulies, D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 403-450, 1993.

- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analyses of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.
- Greenberg, S. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:93-99, 1995.
- Hakansson S, Charron AJ, Sibley L.D. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 20:3132-44; 2001.
- Hall, S.E., Savill, J.S., Henson, P.M., Haslett, C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J. Immunol.*, 153: 3218-3227, 1994.
- Harper J.M., Zhou X.W., Pszeny V., Kafsock B.F., Carruthers V.B. The novel coccidian micronemal protein MIC11 undergoes proteolytic maturation by sequential cleavage to remove an internal propeptide. *Int J Parasitol.* 34:1047-58, 2004.
- Hartnell, A., Steel, J., Turley, H., Jones, M., Jackson, D.G., Crocker, P.R. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood*, 97: 288-296, 2001.
- Hayashi, S., Chan, C. C., Gazzinelli, R. Roberge, F. G. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J. Immunol.* 156: 1476-1481, 1996.
- Holers, V.M., Kinoshita, T. & Molina, H. The evolution of mouse and human complement C3-binding proteins: divergence of form but conservation of function. *J. Biol. Chem.* 267: 231- 236, 1992.
- Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-36, 1995.
- Ian, C. - The macrophage. A review of ultrastructure and function. Academic Press. London/New York. p.11. 1973
- Indik, Z.K.; Park, J.G.; Hunter, S. e Schreiber, A.D. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood*, 86:4389-99, 1995.
- Jewett TJ, Sibley LD. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell.* 11:885-94; 2003.
- Jewett TJ, Sibley LD. The *Toxoplasma* proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. *J Biol Chem.* 279:9362-9; 2004.
- Johnson, S.A.; Pleiman, C.M.; Pao, L.; Schneringer, J.; Hippen, K.; Cambier, J.C. Phosphorylated ITAMs exhibit unique abilities to bind and activate lyn and syk tyrosine Kinases. *J. Immunol.*, 155:1498-4603, 1995.
- Jones, T.C., Hirsch, J.G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Méd.* 136:1173-1194, 1972.
- Jones, T.C., Yeh, S., Hirsch, J.G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Méd.* 136:1157-1172.
- Kahn, I.A., Matsuura, T., Kasper, L.H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol.* 17: 185-195, 1995.
- Kaneto, C.N., Costa A.J., Paulillo, A.C., Moraes, F.R., Murakami, T.O., Meireles, M.V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.* 69: 203-10, 1997.
- Kim K e Boothroyd, J.C. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* 262:911-914, 1993
- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 16:137-61, 1998.
- Lourenco E.V.; Pereira S.R.; Faca V.M.; Coelho-Castelo A.A.; Mineo J.R.; Roque-Barreira M.C.; Greene L.J. e Panunto-Castelo A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology* 11:541-547, 2001.
- Lycke, E.; Norrby, R. Remington, J. Penetration-enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii*, which increases its virulence for mice. *J. Bacteriol.* 96:785-788, 1968.
- Manuel, J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Advances Parasitol.* 38: 1-51, 1996.
- Martinez-Pomares L, Gordon S. Potential role of the mannose receptor in antigen transport. *Immunol Lett.* 65:9-13, 1999.
- Martinez-Pomares L, Mahoney JA, Kaposzta R, Linehan SA, Stahl PD, Gordon S. A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. *J Biol Chem.* 273:23376-80, 1998.

- Martinez-Pomares L, Reid D.M., Brown G.D., Taylor P.R., Tillion R.J., Linehan S.A., Zamze S., Gordon S., Wong S.Y. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol.* 73:604-13, 2003.
- Martinez-Pomares, L. Kosco-Vilbois, M.; Darley, E.; Tree, P.; Herren, S.; Bonnefoy, J.Y.; Gordon, S. Fc Chimeric Protein Containing the Cysteine-rich Domain of the Murine Mannose Receptor Binds to Macrophages from Splenic Marginal Zone and Lymph Node Subcapsular Sinus and to Germinal Centers 184:1927-1937, 1996.
- Martinez-Pomares, L.; Linehan S.A.; Taylor P.R.; Gordon S. Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology*, 204:527-35, 2001
- McCabe, R.E. & Remington, J.S. Mechanism of killing of *Toxoplasma gondii* by rat peritoneal macrophages. *Inf. Immun.* 52: 151-155, 1986.
- Mercier, C. ;Howe, D.K., Mordue, D.; Lingnau, M e Sibley, L.D. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases the virulence in mice. *Infect. Immun.* 66:4176-4182
- Monteiro VG, Lobato CS, Silva AR, Medina DV, de Oliveira MA, Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol Res.* 97:380-5, 2005.
- Mordue DG, hakansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular traffickin pathways. *Exp Parasitol.* 92:87-99.
- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:21-38, 2002.
- Mosser DM, Karp CL. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol.* 11:406-11, 1999.
- Nakamura, K., Yamaji, T., Crocker, P.R., Suzuki, A. Hashimoto, Y. Lymph node macrophages, but not spleen macrophages, express high levels of unmasked sialoadhesin:implication for the adhesive properties of macrpahages in vivo. *Glycobiology*, 3:209-16, 2002.
- Noble, B., K. ren, J. Taverne, J. DiPirro, J. Van Liew, C.D. Dijkstra and P.W.Poulter. Mononuclear cells in glomeruli and cytokines in urine reflect the severity of experimental proliferative immune complex glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 80:281, 1990.
- Norris, K. A., Schrimpf, J. E., Flynn, J. L., Morris Jr., S. M. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine paritoneal macrophage and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 63: 2793-2796, 1995.
- Pontow, S.E.; Kery, V.; Stahl, P.D. Mannose receptor. *Int. Rev. Cytol.* 137B:221- 44, 1992.
- Ravetch, J.V. Fc Receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 9:121-125, 1997.
- Retamal, C.A. , Thiebaut P., Elias W. Protein Purification from polyacrilamide gels by sonication extration. *Analytical Biochemistry - 1999: Microbiol Mol Biol Rev.* 66:21-38, 2002
- Rey, L. Parasitologia. Guanabara Koogan 2 ed, Rio de Janeiro – RJ, 1991.
- Rozental, S., Alviano, C.S. de Souza, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopatholog.* 126: 85-91, 1994.
- Saffer LD, Mercereau-Puijalon O, Dubremetz JF, Schwartzman JD Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool* 39:526-530, 1992
- Sam-Yellowe, T.Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parsitol Today* 12: 308-316, 1996.
- Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368-79,1987.
- Schwab, J.C.; Becjers C.J.M. e Joiner K.A. The parasitophorus vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:509-513, 1994.
- Schwartzman, J.D. Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect. Immun.* 51:760-764, 1986.
- Schwarz, J.A.; Fouts, A.E.; Cummings, C.A. Ferguson, D.P.J. e Boothroyd, J.C. A novel rhoptry protein in *Toxoplasma gondii* bradyzoites and merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144:159-166, 2005.

- Seabra SH, de Souza W, Damatta RA. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 324:744-752, 2004.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages *Exp Parasitol.* 100:62-70, 2002.
- Seabra, S.H.; De Souza, W., DaMatta, R.A. Kinetics of the nitric oxide production inhibition on the mouse macrophages after the interaction with *Toxoplasma gondii*. XV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, Caxambú, MG, 9 a 11 de novembro de 1999
- Sengelov H. Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol.* 15:107-31,1995.
- Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 304:248-53. 2004.
- Sibley LD. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Cell Biology* 5:129-132, 1995
- Sibley, L.D., Niesman, I.R. Parmley, S.F., Cesbron-Delauw, M.F. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubular-vesicular network in host cell vacuole occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 108:1669-1677, 1995.
- Silva SR, Meirelles SS, De Souza W. Mechanism of entry of *Toxoplasma gondii* into vertebrate cells *J Submicrosc Cytol.* 14:471-482, 1982.
- Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 154:95-108, 2001.
- Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol,* 10:50-55, 1998.
- Stein, M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 176:287-92, 1992.
- Stuehr, D.J. & Marletta, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or Interferon- γ . *J. Immunol.* 139: 518-525, 1987.
- Takai, T. Li M.; Sylvestre D.; Clynes, R. e Ravetch J.V. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76:519-29, 1994.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H-H. Brown, G.D., Gordon, S. Macrophages receptors and Immue recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23:901-44, 2005.
- Trembicki KA, Qureshi MA, Dietert RR. Avian peritoneal exudate cells: a comparison of stimulation protocols; *Dev Comp Immunol.* Spring;8:395-402, 1984.
- Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, K., Toyoshima, K., and Seya, T. maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect. Immun.* 68: 6883-6890, 2002.
- Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.*;20:825-52, 2002.
- Unkeless, J.C., Scigliano, E., Freedman, V.H. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann. Rev. Immunol.* 6: 251-81, 1988.
- van den Berg, T.K., Brevé, J.J.P., Damoiseaux, J.G.M.C., Döpp, E.A., Kelm, S., Crocker, P.R., Dijkstra, C.D., Kraal, G. Sialoadhesin on macrophage: Its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 176:647-655, 1992.
- Van den Herik-Oudijk, I.E.; Ter Bekke, M.W.H.; Ternpleman, M.J.; Capel, P.J.A. e Van de Winkel, J.G.J. Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs, *Blood,* 86:3302-3307, 1995.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G.; Langevoort, H.L. - The Mononuclear Phagocyte System: a new classification of macrophages, monocytes and their precursors cell. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 46: 845-852, 1972.
- Vieira, MCF e Moreno SNJ Mobilization of intracellular calcium upon attachment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106:157-162, 2000.
- Werk R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis* 7:449-457, 1985.
- Wilson, C.B., Tsai, V. Remington, J.S. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 151: 328-346, 1980.

Yap, G.S.; Sher, A. Cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201:240-247, 1999.

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](#)