

JULIANA DA CRUZ PADRÃO

IDENTIFICAÇÃO DA VIA DE DEGRADAÇÃO DA *ÓXIDO NÍTRICO*
SINTASE INDUZIDA EM MACRÓFAGOS ATIVADOS E
INFECTADOS PELO *TOXOPLASMA GONDII*

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e Biotecnologia
com ênfase em Biologia Celular.

Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil
Fevereiro de 2009.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dedico essa dissertação a quem me fortalece, inspira e faz-me a mãe mais feliz deste mundo, a minha amada Maria Clara Padrão Tavares

*O Senhor é o meu rochedo, minha fortaleza e meu libertador.
Meu Deus é minha rocha, onde encontro o meu refúgio,
Meu escudo, força de minha salvação e minha cidadela.*

Sl. 17: 3

Agradecimentos

1. Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e por ter me guiado durante o mesmo.
2. Agradeço ao meu marido Pedro Tavares e a minha filha Maria Clara Padrão pelo amor que me fortalece.
3. Agradeço ao meu pai Rui Padrão, a minha mãe Martha Padrão, minha irmã Manuella Padrão, ao meu cunhado Peter Monteiro e a toda minha família pelo incentivo e exemplo.
4. Agradeço ao Prof. Dr. Renato DaMatta, com todo carinho e admiração, a oportunidade de realizar este trabalho.
5. Agradeço à Prof^a. Dr^a. Fátima Sarro pela orientação e amizade.
6. Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra, primeiro pela alegria, otimismo e incentivo, também pelas ajudas na imunofluorescência e pelos reagentes. Agradeço também ao Prof. Dr. Sibley pelos anticorpos para o western blotting.
7. Agradeço ao Prof. Milton e ao Prof. Medina pela ajuda na realização dos western blotting sempre me conduzindo com simpatia, prontidão e dedicação. Meus sinceros agradecimentos.
8. Agradeço ao querido Prof. Wilmar Dias, com toda a minha admiração, por me conduzir de forma simples e brilhante na minha pesquisa, contribuindo muito para meu aprendizado científico e me ensinando, com seu exemplo acima de tudo, a amar a ciência. Agradeço também pelos anticorpos secundários para os western blotting.
9. Agradeço ao LBR, em especial a Claudia Láticia e a David Gitirana pelas ajudas nos experimentos.
10. Agradeço ao LBT, em especial a Zila e a Cristina pelo carinho, prontidão e ajudas nos experimentos de western blotting.
11. Agradeço à minha amiga Laura Mota pela amizade, presença, incentivo e carinho.
12. Agradeço aos funcionários do LBCT e em especial Darly Keller, Rosemary Maciel, Adriana Martins, Geovana Moraes e Beatriz Ribeiro. Agradeço, com muita admiração, a ajuda e a prontidão.
13. Agradeço ao Fábio Conceição por me ensinar a suportar os camundongos.
14. Agradeço aos amigos do laboratório pela convivência agradável.
15. Agradeço ao revisor dessa dissertação, Prof. Dr. Arthur Giraldi, pelas sugestões e correções.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas.....	VII
Lista de figuras, tabelas.....	IX
Resumo.....	XI
Abstract.....	XII
1. Introdução.....	1
1.1. Macrófagos.....	1
1.2. NO e <i>iNOS</i>	4
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	7
1.4. Proteossomo.....	15
1.5. Calpaína.....	18
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Macrófago.....	21
4.2. Obtenção de <i>T. gondii</i>	21
4.3. Interação de <i>T. gondii</i> com Macrófagos J774-A1 e tratamento com clasto lactocistina β lactona ou Calpeptina.....	21
4.4. Expressão da <i>iNOS</i> revelada por imunofluorescência.....	22
4.5. Avaliação de nitrito.....	22
4.6. Dot blotting para obtenção de concentração ideal do anticorpo anti- <i>iNOS</i>	23
4.7. Detecção da <i>iNOS</i> por Western blot.....	23
4.8. Estatística.....	23
5. Resultados.....	24
6. Discussão.....	31
7. Conclusão.....	34
8. Referências bibliográficas.....	35

Lista de siglas e abreviaturas

- AIDS/SIDA: Síndrome de imunodeficiência adquirida
- ARG: Arginina
- BH₄: Tetrahidrobiopterina
- BSA: Albumina sérica bovina
- CaM: Calmodulina
- CD14: *Cluster of differentiation* 14, sistema CD de nomenclatura que identifica moléculas de superfície
- DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- FAD: Flavina adenina Dinucleotídeo
- FMN – Flavina Mononucleotídeo
- GM-CSF: Fator estimulador de colônia macrófago-granulócito
- H: Heme
- HMGI (Y): Grupo de proteínas de alta mobilidade, isoformas I e Y
- IFNR1: Receptor de Interferon 1
- IFNR2: Receptor de Interferon 2
- IFN- γ : Interferona-gamma
- IgG: Imunoglobulina G
- IL- 2: Interleucina 2
- IL- 4: Interleucina 4
- IL-6: Interleucina 6
- IL- 10: Interleucina 10
- IL-12: Interleucina 12
- IL-13: Interleucina 13
- iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida
- Jak: Janus quinase
- LBP: Proteína ligadora de LPS
- LPS: Lipopolissacarídeo
- μ g: Microgramas
- μ m: Micrômetros
- μ l: Microlitros

- M: Molar
- MAF: Fator de ativação de macrófago
- MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno
- MD-2: Fator de diferenciação de mielóide-2
- mg: Miligramas
- MG-132: N-carbobenzoxyl-L-leucinyll-L-leucinyll-L-norleucinal
- MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
- ml: Mililitros
- mM: Milimolar
- MØ: Macrófago
- NaCl: Cloreto de sódio
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
- NF-κB: Fator de transcrição nuclear
- NO: Óxido nítrico
- OPN: Osteopontina
- PBS: Solução salina tamponada de fosfato
- PS: Fosfatidilserina
- ROP16: Proteína da rópria 16
- SFB: Soro fetal bovino
- STAT: *Signal transducers and activators of transcription*
- TGF-β: Fator transformador de crescimento-β
- Th1: subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4+
- TLR-4: receptor Toll-like 4
- TNF-α: Fator de necrose tumoral α
- VP: Vacúolo parasitóforo

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Esquema 1: Processo de maturação e ativação de macrófagos (Modificada de ADAMS, 1994).....	1
Esquema 2: Estrutura da óxido nítrico sintase induzida. Os sítios de ligação de L-arginina (ARG), heme (H), tetrahydrobiopterina (BH ₄), calmodulina (CaM), Flavina Mononucleotídeo (FMN), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P (NADPH) estão indicados (Modificada de KONE et al., 2003).....	5
Esquema 3: Ativação, transcrição e função da óxido nítrico sintase induzida (LOWENSTEIN & PADALKO, 2004).....	7
Esquema 4: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> (Fonte: Dissertação de Miriam e Souza Macre, SP,2002).....	9
Esquema 5: Desenho esquemático baseado em micrografia eletrônica mostrando as organelas de taquizoítos (esquerda) e bradizoítos (direita) de <i>Toxoplasma gondii</i> . (Modificada de DUBEY et al. 1998).....	11
Esquema 6: Representação esquemática dos mecanismos efetores regulatório e anti-parasítico durante a infecção com <i>Toxoplasma gondii</i> . DC: células dendríticas, NK: células matadoras naturais, NO: óxido nítrico, Trp: triptofano. Fonte: LANG et al.,2007).....	12
Esquema 7: Subunidade 26 do proteossomo (LOWENSTEIN & PADALKO, 2004).....	16
Esquema 8: Estrutura quaternária da m-Calpaina humana. (STROBL et al., 2000).....	18
Tabela 1. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados e residentes infectados ou não.....	24
Tabela 2. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não e tratados com calpeptina ou não.....	28
Figura 1. Expressão de <i>óxido nítrico sintase induzida</i> em macrófagos ativados e infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> (seta) por 2h.. A.	

Contraste Interferencial, B. Microscopia de fluorescência. Note como o macrófago infectado não expressa iNOS.....25

Figura 2. Expressão de *óxido nítrico sintase induzida* (iNOS) em macrófagos ativados tratados com Clasto Lactocistina β Lactona, infectados com *Toxoplasma gondii* (seta) por 2h. A. Contraste Interferencial , B. Microscopia de fluorescência. Note presença da iNOS no macrófago infectado.....26

Figura 3. Expressão de *óxido nítrico sintase induzida* em macrófagos ativados tratados com Clasto Lactocistina β Lactona, infectados com *Toxoplasma gondii* (seta) por 6h. A. Contraste Interferencial , B. Microscopia de fluorescência.....27

Figura 4. Expressão de *óxido nítrico sintase induzida* (iNOS) em macrófagos ativados 24h. A, B, C: Concentração crescente do anticorpo primário anti-iNOS, 1A – 1:1000; 2A – 1:500B; 3A – 1:250. 1B – controle do anticorpo secundário anti-rabbit usando como anticorpo primário anti-*Toxoplasma gondii* na amostra de macrófagos ativados infectados com o parasita. A: Imagem geral, B: Note 1B marcado, C: Note 2A marcado e 3A mais marcado que 2A.....29

Figura 5. A, B: Detecção da *óxido nítrico sintase induzida* em cultura de macrófagos em diferentes situações por 6h. 1: Macrófagos ativado (controle); 2: Macrófago ativado e infectado com *Toxoplasma gondii* 6h; 3: Macrófago ativado, tratado com clasto lactocistina β lactona e infectado com *T. gondii* , 4: Macrófago ativado, tratado com calpeptina e infectado com *T. gondii*. A. a.: Densitometria óptica da fig. A; B. b. Densitometria óptica da fig. B. n=2.....30

RESUMO

O macrófago peritoneal de camundongo quando ativado com LPS e IFN- γ produz NO que é um agente microbicida. Esta produção é catalisada pela iNOS que utiliza arginina como substrato produzindo NO e citrulina. No entanto, tem sido demonstrado que a produção de NO é inibida pela infecção do *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose. Esta inibição é causada pelo desaparecimento da iNOS conforme visualizado por imunofluorescência. Duas vias de degradação da iNOS foram descritas, através da ação: 1) do proteossomo ou 2) da calpaína. O objetivo deste trabalho é identificar a via de degradação da iNOS após a infecção de macrófagos ativados pelo *T. gondii*. Para tal a linhagem de macrófagos J774-A1 foi cultivada em garrafas com meio de cultura DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). O *T. gondii*, cepa RH, foi mantido por passagens, após 2-3 dias, na cavidade peritoneal de camundongos Swiss. Para as infecções, macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços ou placas de Petri com DMEM com 5% de SFB e ativados com LPS e IFN- γ 24h antes das interações. Os macrófagos foram tratados com clasto-lactocistina β lactona (inibidor do proteossomo); ou com calpeptina (inibidor da calpaína) por 1h após o plaqueamento e a interação foi realizada com 10 parasitas por macrófago. As células foram coletadas 2, 6 e 24h após a infecção para a dosagem de NO através da técnica de Griess. A iNOS foi detectada por imunofluorescência, dot e western blotting. Macrófagos infectados tratados com clasto-lactocistina β lactona (via de degradação pelo proteossomo inativada) apresentaram expressão da enzima iNOS no citoplasma maior que macrófagos infectados não tratados. Macrófagos infectados tratados com calpeptina (via das calpaínas inativada) produzem menos NO que macrófagos não infectados, assim como os infectados não tratados. Concluindo, podemos afirmar que o mecanismo de degradação da iNOS em macrófagos infectados é pela a via do proteossomo.

Palavras chaves: Macrófago, *Toxoplasma gondii*, Óxido Nítrico Sintase Induzida, Proteossomo, Calpaína.

ABSTRACT

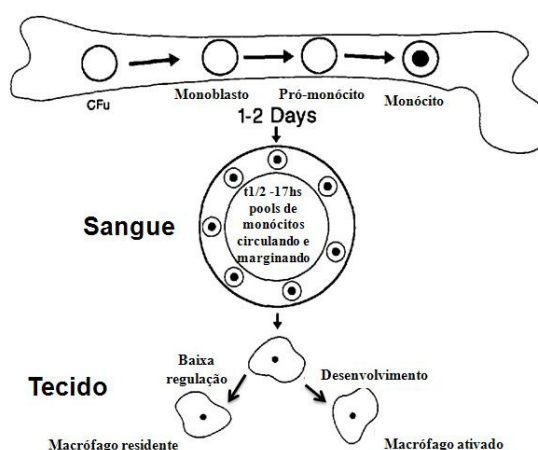
Activated peritoneal macrophages with lipopolysaccharide and Interferon-gamma produce nitric oxide (NO), which is a microbicidal agent. This production is catalyzed by inducible nitric oxide synthase (iNOS), which uses arginine as substrate producing NO and citrulline. However, it has been demonstrated that NO production is inhibited by *Toxoplasma gondii* infection, the agent that causes toxoplasmosis. This inhibition is caused by iNOS disappearance as visualized by immunofluorescence. Two iNOS degradation pathways have been described: the proteasome pathway or the calpaine pathway. This work aims the identification of the iNOS degradation pathway after *T. gondii* infection of activated macrophages. For this, J774-A1 macrophage cell line was cultured with DMEM supplemented with FBS 5 percent. The *T. gondii* (RH strain) was maintained in the peritoneal cavity of Swiss mice. Macrophages were activated with lipopolysaccharide and Interferon-gamma for 24h, treated with lactacystine (proteasome inhibitor), or with calpeptine (calpaine inhibitor) for 1h, and infected with the parasite. Coverslips were collected after 2, 6 and 24h to assay iNOS expression by immunofluorescence and the supernatant after 6 and 24h of interaction was evaluate to determine NO production. iNOS also was detected by Western blotting. iNOS was not visualized in macrophages infected with *T. gondii*. Lactacystine treated macrophages infected with *T. gondii* showed iNOS expression. Calpeptin treated macrophages infected with *T. gondii* show NO production was inhibited. These results indicate that *T. gondii* infection activates the proteasome pathway degrading iNOS.

Key words: Macrophage, *Toxoplasma gondii*, Inducible Nitric Oxide Synthase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Macrófagos

Uma das funções do sistema imune é proteger contra infecções controlando o desenvolvimento e a virulência de patógenos que invadem um organismo. O macrófago (MØ) é uma célula do sistema imunológico, pertence à linhagem mielóide, sendo derivado de uma célula hematopoiética multipotente na medula óssea durante a fase adulta (SASMONO & HUME, 2004). O MØ é a principal célula diferenciada do sistema mononuclear fagocítico, que inclui monoblastos, promonócitos e monócitos (Auger & Ross, 1992). A ativação de MØ com IFN- γ desencadeia mecanismos microbicidas e antitumorais (SCHRODER et al., 2004). No esquema 1, é possível observar o processo de maturação e ativação dos MØs de forma resumida. Na linhagem mielóide, a célula multipotente se diferencia em monoblasto, pró-monócito e monócito na medula óssea. Dentro de dois dias, o monócito entra na corrente sanguínea e permanece circulando de 1/2 a 17h. Esses monócitos vão para o tecido, se diferenciando em MØs. Esses macrófagos serão ativados caso haja uma inflamação no tecido ou residentes caso não haja inflamação.



Esquema 1: Processo de maturação e ativação de macrófagos (Modificado de ADAMS, 1994).

O sistema mononuclear fagocítico tem sido definido como uma linhagem de células compreendendo precursores da medula óssea, monócito e MØs. Porém, tem sido proposto por Hume (2006) que o conceito de linhagem de célula se tornará redundante quando se aumentar o conhecimento da rede transcricional e plasticidade celular. Hume (2006) descreve que a transcrição é um processo probabilístico. Mesmo dentro de um *pool* de células, cada MØ individual, por exemplo, tem um perfil transcricional singular, e a expressão de um gene não prediz certamente a expressão de outro gene em situações particulares, devido a outro microambiente e estímulo. Então, o número de tipos celulares que se pode definir no sistema imune inato é provavelmente uma função exponencial do número de marcadores que se escolheu empregar. Assim, o sistema imune inato é melhor descrito como uma rede de genes interagindo (HUME, 2006).

Os MØs são amplamente distribuídos pelo organismo, sendo encontrados principalmente em órgãos linfóides, fígados, pulmões, trato gastrointestinal, cavidades serosas, osso, sinóvia, pele, etc (AUGER & ROSS, 1992) e seus números aumentam na inflamação e ferimento (HUME, 2006). Células da microglia são consideradas como MØs residentes do cérebro, porque eles são participantes ativos na resposta imune no sistema nervoso central (ROZENFELD et al., 2005).

Uma das principais funções dos MØs é a fagocitose e eliminação de células senescentes. Outra função crucial destas células é a secreção de várias moléculas. Camundongos com mutação no gene que codifica o fator chave de crescimento de macrófago (HUME, 2006), tem sido utilizados para melhor entender a função destas células. Estudos com esses camundongos mostram que os MØs também apresentam habilidade em secretar grande diversidade de moléculas reguladoras que influenciam funções fisiológicas e diferenciação de células vizinhas.

Receptores na superfície de MØs determinam o controle de suas atividades. Muitos ligantes têm sido descritos na superfície de MØs (revisito por AUGER & ROSS, 1992). Mais de 100 receptores específicos de superfície têm sido identificados em MØs, incluindo receptores para citocinas, componentes do complemento, imunoglobulinas e moléculas de adesão (ADAMS, 1994). Receptores de superfície de macrófagos regulam muitas funções incluindo

diferenciação, crescimento, sobrevivência, adesão, migração, fagocitose, ativação e citotoxicidade. A habilidade desses receptores para reconhecer uma ampla variedade de ligantes endógenos e exógenos e para responder apropriadamente é essencial para as funções desempenhadas pelo MØ na homeostase, assim como na defesa do hospedeiro na imunidade inata e adquirida, autoimunidade, inflamação e imunopatologias (GORDON, 2002; GORDON, 2003a; KAUFMANN et al. 2004). Estudos da expressão de antígenos e receptores de antígenos com anticorpos monoclonais mostram que macrófagos do tecido se tornam marcadamente heterogêneo e expressa diferentes fenótipos, refletindo a especialização da função com o microambiente particular (TAYLOR et al. 2005).

O IFN- γ , por exemplo, tem sido descrito como o principal constituinte do fator de ativação de macrófagos (MAF). A ligação de TNF- α , GM-CSF ou IL-2 aos receptores na superfície de macrófagos fazem parte da atividade do MAF (AUGER & ROSS, 1992).

MØs residentes são achados em tecido onde não há inflamação (AUGER & ROSS, 1992) ou quando obtidos de organismos normais (não infectados) e, portanto, sem inflamação. MØs residentes apresentam capacidade mínima de destruir microorganismos, secretando proteases em baixa quantidade e pouca capacidade de responder a citocinas (ADAMS & HAMILTON, 1984). MØs ativados exibem aumento em uma ou mais atividades funcionais ou adquirem novas atividades funcionais (AUGER & ROSS, 1992). Esses ganham competência para cumprir uma ou muitas funções complexas, como destruição de células tumorais ou parasitas intracelulares obrigatórios ou facultativos (ADAMS, 1994) através, por exemplo, da produção de NO (STUEHR & MARLETTA, 1985).

Estudos mais recentes descrevem a ativação de macrófagos como sendo clássica ou alternativa (MOSSER & EDWARD, 2008; GORDON, 2003a). O termo ativação clássica é designado para macrófagos efetores, que são produzidos na resposta imune mediada por células. Na ativação clássica, a ativação de macrófagos depende de produtos de linfócitos T helper Th1 e células NK, em particular IFN- γ . O MØ se torna mais microbicida, produzindo NO. A ativação alternativa é realizada por IL-4 e IL-13, geradas na resposta

Th2 (GORDON, 2003^a; SEABRA et al., 2002). Nessa ativação, o macrófago produz IL-10 e não é microbicida. *T. gondii* induz a alternância da ativação do MØ, de ativação clássica para alternativa (SEABRA et al., 2002).

Em resposta a inflamação e a estimulação imunológica, monócitos são recrutados ao sítio local, onde eles disparam diferentes fenótipos. O MØ adapta seu microambiente local e torna-se difícil distinguir do MØ residente original, que ele mesmo submeteu a ativação pelo estímulo local. Exposição do MØ a produtos microbicidas e citocinas como IFN- γ , *in vitro and in vivo*, induzem um estado de ativação diferente. Esses estímulos modulam a expressão de receptores de superfície, atividades secretórias, apresentação de antígenos e co-estimulação e resposta linfócito antígeno específica. (TAYLOR et al. 2005).

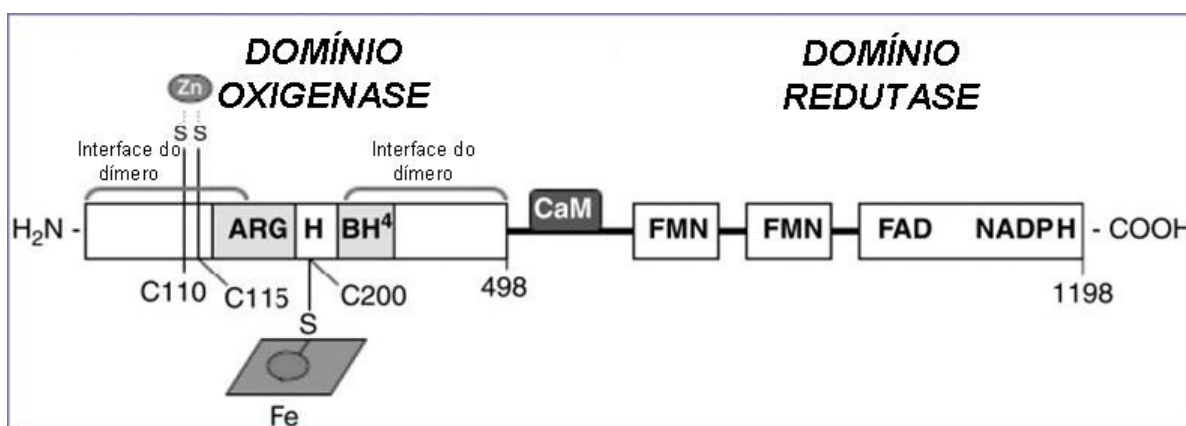
1.2. NO e iNOS

O gás NO é um radical livre que tem capacidade de se difundir através de membranas biológicas; funciona como um agente microbicida produzido por macrófagos ativados a partir do aminoácido L-Arginina. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, NOS (ADAMS, 2004). O NO interage com muitas vias metabólicas requeridas para sobrevivência do patógeno, mas pode paradoxalmente causar danos ao tecido hospedeiro (MACMICKING et al., 1995). NO e superóxidos (O_2^-) são radicais efetores do sistema imune que inibem diretamente a replicação de patógenos. Portanto, derivados de NO bloqueiam infecções (NATHAN & SHILOH, 2000).

Existem três principais isoformas de NOS em mamíferos: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzida (iNOS). A eNOS e a nNOS são constitutivas. iNOS é uma enzima que contém um domínio C-terminal redutor, que liga NADPH transferindo elétrons para FAD e então para FMN; outro domínio N-terminal oxidante contendo um grupo heme, e sítios de ligação de arginina, tetrahydrobiopterina e calmodulina. Ao contrário das outras isoformas, a iNOS é independente de cálcio para sua ativação. A iNOS utiliza oxigênio e elétrons da NADPH para oxidar o substrato L-arginina em um intermediário OH-L-arginina, que é então oxidado resultando na liberação de

NO e L-citrulina (LOWENSTEIN & PADALCO, 2004), conforme demonstrado no esquema 2.

A iNOS é induzida nas células de todos os tecidos por citocinas, endotoxinas e outros estímulos pré-inflamatórios. Algumas citocinas induzem a expressão da iNOS (IFN- γ , TNF- α), outras agem como citocinas inibitórias, TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13 (DE SERVI et al., 2002; HESSE et al., 2001; ROZENFELD et al., 2005). Sua atividade requer a ligação de calmodulina e BH₄ e a formação de um homodímero (KONE et al., 2003). A dimerização da iNOS é requerida para sua atividade sendo então um processo regulatório e um alvo para intervenção terapêutica (KONE et al., 2003).



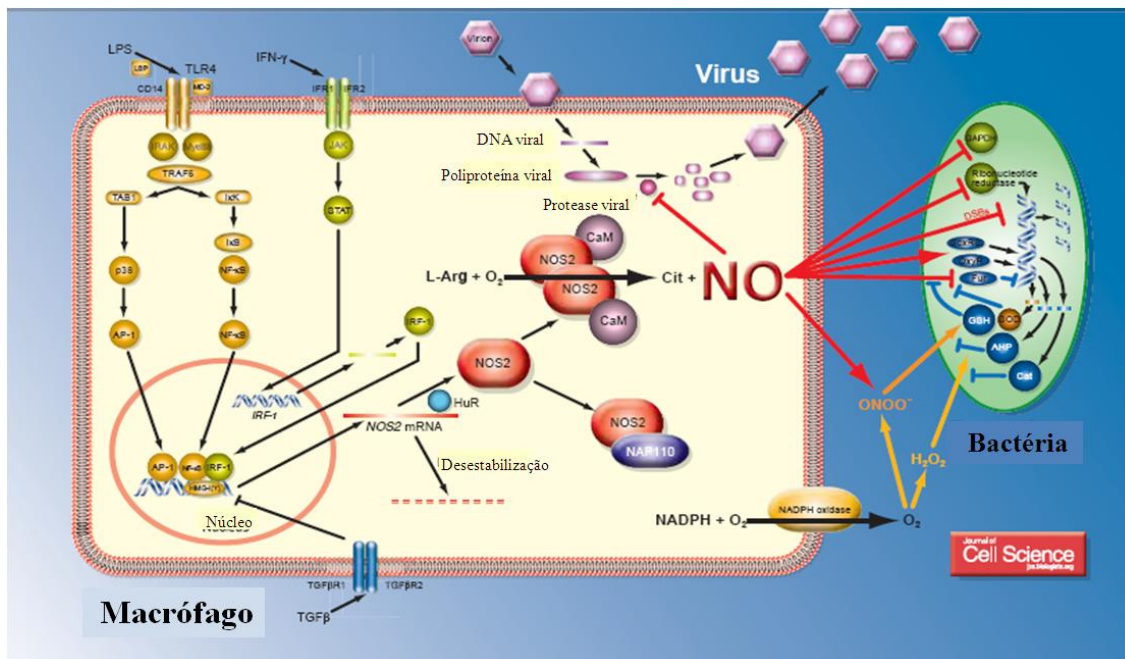
Esquema 2: Estrutura da óxido nítrico sintase induzida. Os sítios de ligação de L-arginina (ARG), heme (H), tetrahydrobiopterina (BH₄), calmodulina (CaM), Flavina Mononucleotídeo (FMN), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P (NADPH) estão indicados (Modificado de KONE et al., 2003).

iNOS interage com moléculas inibitórias, como Kalirina, tão bem quanto com proteínas ativadoras a Rac GTPase. Moléculas inibitórias agem inibindo a atividade catalítica da iNOS prevenindo a dimerização. E moléculas ativadoras podem redirecionar a iNOS na célula e aumentar a produção de NO. Além disso, interações entre proteínas que controlam a função da transcrição da iNOS especificam a ativação ou supressão da indução da iNOS por citocinas (KONE et al., 2003).

TGF- β inibe a expressão da iNOS através de mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais (VODOVOTZ et al., 1993). TGF- β bloqueia a transcrição da iNOS por bloquear a expressão das proteínas enoveladoras HMG-I(Y). Muitas outras moléculas sinalizadoras, incluindo IL-4, IL-10, IL-13 e fator de desativação de macrófago, inibem a expressão da iNOS por mecanismos ainda não conhecidos (LOWENSTEIN & PADALKO, 2004).

Uma variedade de estímulos extracelulares podem ativar diferentes vias de sinalização que convergem para iniciar a expressão da iNOS. Componentes da parede celular de bactérias e fungos podem disparar cascatas de sinalização, levando a expressão da iNOS. Lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, pode se ligar à proteína ligadora de LPS (LBP), que transfere o LPS ao CD14, um receptor de alta afinidade para LPS. O receptor Toll-like 4 (TLR4) junto com uma pequena proteína extracelular, a MD-2, interage com o complexo CD14-LPS, e então ativa uma cascata de sinalização intracelular, incluindo a via MAPK e a via do NF- κ B. Essas vias convergem para a ativação da transcrição da iNOS (LOWENSTEIN & PADALKO, 2004).

O IFN- γ produzido por macrófagos e linfócitos ativados ativa a expressão da iNOS, e pode sinergicamente aumentar a expressão junto com outros agentes, como o LPS. IFN- γ interage com o receptor de interferon 1 (IFNR1) e o complexo IFNR2 que ativam quinases da família Jak e STAT (DARNELL et al., 1994). A via de ativação do IFN- γ pode também ativar a transcrição da iNOS (LOWENSTEIN & PADALKO, 2004). O esquema 3 mostra resumidamente o processo de ativação da transcrição da iNOS e algumas de suas funções.



Esquema 3: Ativação, transcrição e função da óxido nítrico sintase induzida (Modificado de LOWENSTEIN & PADALCO, 2004).

A transcrição de iNOS é controlada pela proteína OPN, um potente transrepressor da expressão da iNOS. A concentração de OPN aumenta quando há ativação com o LPS. Em modelos de macrófagos murinos, estimulados com o LPS, a OPN aumenta a ubiquitinação da STAT1, e sua subsequente degradação pela subunidade 26 do proteossomo, para então inibir a atividade do promotor da iNOS, sua transcrição e expressão (GAO et al., 2007).

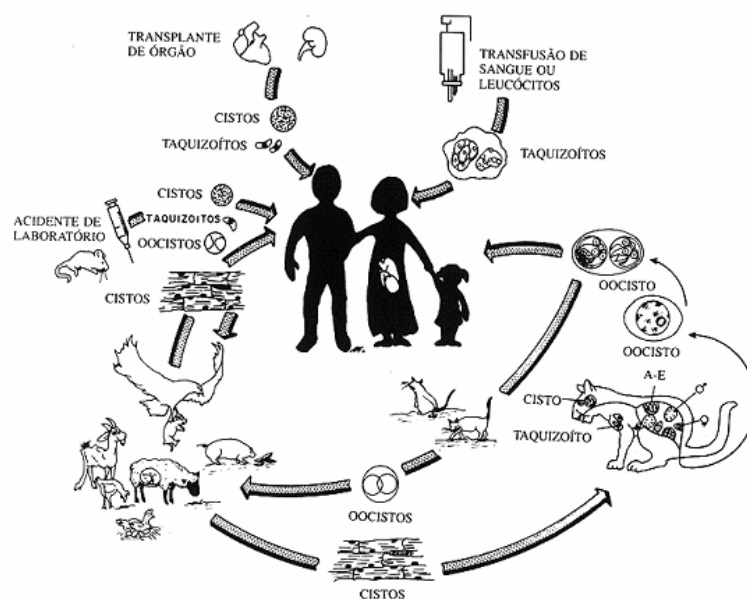
1.3. *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose, uma doença infecciosa de alta prevalência mundial, é causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório (TENTER et al., 2000). Esse parasita é amplamente distribuído pelo mundo, em ampla gama de hospedeiros, e é considerado um dos mais bem sucedidos na Terra (CARRUTHERS, 2002). A maioria das infecções é assintomática, mas doenças graves podem surgir em indivíduos imunocomprometidos (TENTER et al., 2000).

O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, pertence ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidica, Subordem Eimeriida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma*, Espécie *Toxoplasma gondii* (TENTER et al., 2000). Esse parasita infecta organismos vertebrados de sangue quente, sendo os felinos seus hospedeiros definitivos (DENKERS & GAZZINELLI, 1998, DUBEY, 1986).

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida complexo (Esquema 4), com fase assexuada, no hospedeiro intermediário e sexuada no hospedeiro definitivo. A fase assexuada tem início quando oocistos e/ou cistos teciduais são ingeridos pelo hospedeiro. Os esporozoítos ou bradizoítos são liberados, infectam os enterócitos e transformam-se em taquizoítos, uma forma de rápida multiplicação. A multiplicação ocorre dentro do vacúolo parasitóforo (VP), até que haja o rompimento da célula e a liberação dos parasitas para, então, infectar novas células (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Taquizoítos da última geração podem iniciar a segunda fase de desenvolvimento, convertendo-se em bradizoítos, com formação de cistos teciduais. Dentro dos cistos, bradizoítos multiplicam-se lentamente. Os cistos localizam-se predominantemente no sistema nervoso central, músculos cardíacos e esqueléticos. Em algumas espécies de hospedeiros intermediários, os cistos permanecem por toda a vida (TENTER et al., 2000).

A fase sexuada do ciclo do parasita inicia-se com a ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos por felinos. Os oocistos rompem-se liberando esporozoítos, os cistos liberam bradizoítos. Estas duas formas invadem as células epiteliais intestinais onde ocorre a formação de taquizoítos. Estes se multiplicam e invadem as células vizinhas e disseminam a infecção. Parasitas que se multiplicam no epitélio intestinal de felinos podem iniciar a fase sexuada do ciclo de vida. Para tal, estes se diferenciam em várias formas intermediárias até que se transforma em gametócitos masculinos e femininos, e fecundam-se formando o zigoto, que se desenvolvem nas células epiteliais intestinais até o estado de oocisto, que será eliminado nas fezes. Os oocistos, ao serem liberados no ambiente, esporulam e, em cerca de quatro dias, geram esporozoítos aptos a infectar novos hospedeiros (FRENKEL et al., 1970).



Esquema 4: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* (Fonte: Dissertação de Miriam de Souza Macre, USP, 2002).

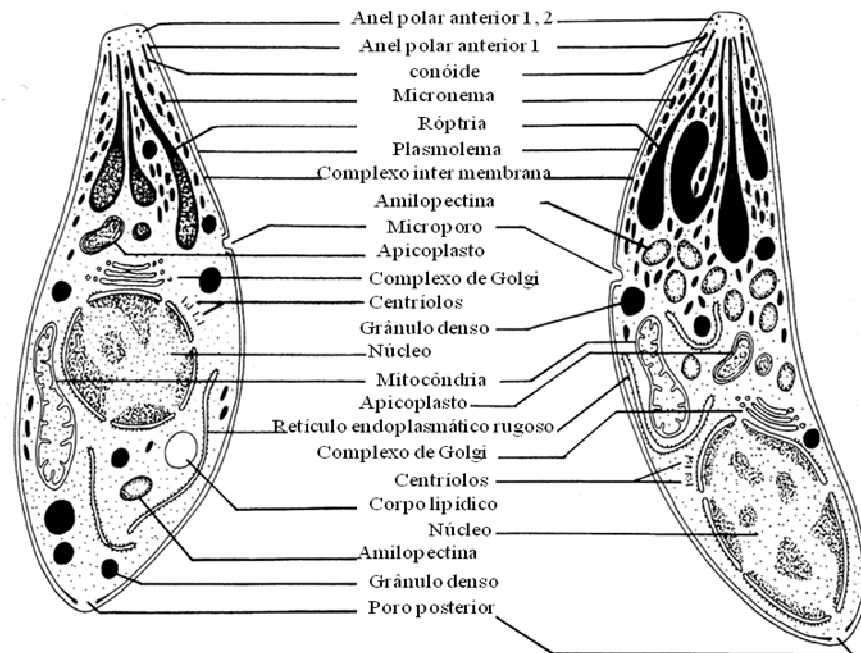
Uma característica do ciclo de vida do *T. gondii* é a habilidade desse parasita de induzir infecção crônica por um longo período em teoricamente todos os mamíferos ou aves. Isso ocorre devido às adaptações hospedeiro-parasita, incluindo o processo de diferenciação do parasita, como a conversão da forma de taquizoíto para a forma de bradizoíto, formação e remodelamento do VP sendo um compartimento intracelular “seguro” e modulação da resposta imune hospedeira, tanto para sinais externos quanto para infecção intracelular (LÜDER et al. 2009).

O grupo dos Apicomplexa é caracterizado pela presença do complexo apical, importante no processo de penetração ativa realizado pelo parasita (DUBREMETZ, 1998). A penetração ativa do parasita na célula hospedeira está relacionada a sua sobrevivência no interior da célula. Ao contrário, na fagocitose, o processo é direcionado pelo fagócito e culmina na morte do parasita dentro do fagolisossoma. A fagocitose ocorre geralmente com parasitas opsonizados com anticorpos (WILSON et al., 1980).

Na penetração ativa ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo (VP). O parasita comprime-se na junção formada entre a membrana da célula hospedeira e o parasita (ALEXANDER et al., 2005). Esse processo permite que componentes da membrana da célula hospedeira sejam excluídos da

membrana do novo VP onde o parasita reside (LINGELBACH & JOINER, 1998). No entanto, proteínas da membrana da célula hospedeira são seletivamente excluídas da membrana do VP, enquanto que proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol são incluídas (MORDUE et al., 1999), levando à formação de um vacúolo que resiste a típica fusão que ocorre entre fagossomo e lisossomo e que não acidifica (JONES AND HIRSCH, 1972; SIBLEY et al., 1985; JOINER et al., 1990), permitindo a sua sobrevivência (DUBREMETZ, 1998).

Toxoplasma gondii possui uma via secretora bem desenvolvida que inclui retículo endoplasmático, complexo de Golgi e três organelas distintas morfológicamente, características dos apicomplexa: róptrias, micronemas e glânulos densos (LIENDO & JOINER, 2000). Róptrias e micronemas liberam seus conteúdos no momento da invasão. As proteínas das micronemas são, possivelmente, usadas para o reconhecimento da célula hospedeira, ligação e motilidade, enquanto que os produtos das róptrias podem ser usados para a formação do VP. A exocitose dos grânulos densos ocorre após a invasão e continua durante a residência intracelular do parasita (Dubremetz, 1998). O esquema 5 mostra as organelas nas formas de taquizoítos e bradizoítos do *T. gondii*.

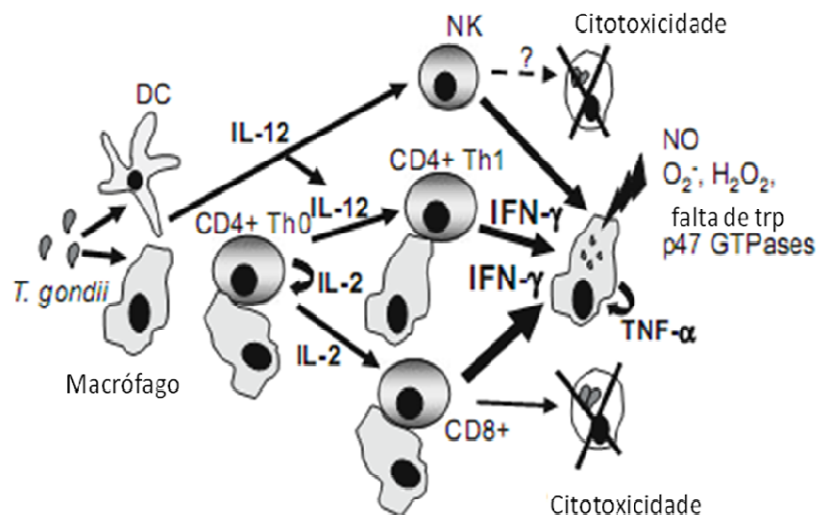


Esquema 5: Desenho esquemático baseado em micrografia eletrônica mostrando as organelas de taquizoítos (esquerda) e bradizoítos (direita) de *Toxoplasma gondii*. (Modificado de DUBEY et al. 1998).

Mecanismos imunes mediados por células desempenham as principais funções no controle da infecção com *T. gondii*, porque o parasita é exclusivamente intracelular (YAP & SHER, 1999; DENKERS & GRAZZINELLI, 1998, ROZENFELD et al., 2005). Em hospedeiros imunocompetentes, os parasitas induzem uma forte resposta tipo I mediada por célula T, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ . A infecção de *T. gondii* é letal na ausência dessas citocinas. No entanto, a forte resposta Th1 gerada durante a infecção deve ser regulada por fatores anti-inflamatórios, como IL-10, para que a resposta não leve a uma doença imunológica. STAT1 é essencial para mediar os efeitos do IFN- γ . Camundongos deficientes na sinalização STAT1 são extremamente susceptíveis a infecções virais e bacterianas (LANG et al., 2007).

Macrófagos e células NK são a primeira linha de defesa contra o parasita durante a fase inicial da infecção (SHER et al., 1993; GAZZINELLI et al., 1993, LANG et al., 2007). IL-12, produzida por macrófagos, neutrófilos e especialmente por células dendríticas, é crucial para a indução de uma resposta imune eficiente ao *T. gondii*, que resulta na diferenciação e expansão

clonal de células T, tipo Th1, (LANG et al.,2007). O esquema 6 mostra de forma resumida a resposta imune contra infecção aguda de *T. gondii*.



Esquema 6: Representação esquemática dos mecanismos efetores regulatório e anti-parasítico durante a infecção com *Toxoplasma gondii*. DC: células dendríticas, NK: células matadoras naturais, NO: óxido nítrico, Trp: triptofano. Fonte: LANG et al.,2007).

Em contraste, *T. gondii* é um patógeno oportunista em indivíduos imunocomprometidos, por exemplo, pacientes que sofrem de AIDS ou são submetidos a terapia imunossupressora. A infecção com *T. gondii* pode resultar em toxoplasmose com encefalite, lesões necróticas no sistema nervoso central ou retinocoroidites (AMBROISE-THOMAS & PELLOUX 1993; FERREIRA & BORGES 2002, LANG et al., 2007).

É evidente, hoje, que o parasita antagoniza parcialmente ou mesmo subverte a resposta inflamatória hospedeira. Além de regular positivamente moléculas anti-inflamatórias hospedeiras como IL-10, TGF- β e lipoxina 4, *T. gondii* também modula diretamente diferentes cascatas de sinalização pré inflamatória (BUTCHER et al., 2001, 2005; KIM et al., 2004; SEABRA et al., 2004; SHAPIRA et al., 2005). Junto com os efeitos anti-inflamatórios, a infecção com *T. gondii* restringe a produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α das células dendríticas, macrófagos e/ou células T. Ativação de STAT3 dirigida pelo parasita suprime a produção de TNF- α e IL-12 induzido pelo LPS em células

hospedeiras não infectadas com *T. gondii* (BUTCHER et al., 2005). Enquanto em células infectadas, STAT3 é ativado pela ligação com receptor de IL-10, em células infectadas com *T. gondii* a ativação de STAT3 é independente de IL-10 para estabelecer um meio ambiente que efeitos anti- inflamatórios contrabalançam respostas pré-inflamatórias do hospedeiro. A habilidade para modular a sinalização de STAT3 difere significativamente dependendo da linhagem genotípica do *T. gondii* e da ROP16, uma proteína da rópria que é uma organela específica dos apicomplexas (SAEIJ et al., 2007).

Durante a fase efetora da resposta imune, IFN- γ é envolvido no controle da infecção do *T. gondii* (SUZUKI et al. 1988). IFN- γ ativa tanto células efectoras hematopoiéticas quanto não-hematopoiética para restringir a replicação de parasitas intracelulares ou mesmo matar *T. gondii* intracelular (YAP & SHER 1999). Dependendo da espécie hospedeira, a formação de espécies reativas de oxigênio e NO ou a falta de triptofano pode realizar um importante efeito anti-parasítico induzido pelo IFN- γ . Junto com o IFN- γ , outras citocinas pré inflamatórias, como exemplo, TNF- α , IL-6 e IL-1, tem efeitos sinérgicos na indução da resposta imune adequada contra *T. gondii* (SIBLEY et al. 1991; LANGERMANS et al. 1992; CHAO et al. 1994; HALONEN et al. 1998 LANG et al. 2007). *T. gondii* dispara a secreção tanto de citocinas pré inflamatórias (IFN- γ , IL-12, TNF- α) quanto anti-inflamatórias (TGF- β , IL-10) depois da infecção na fase aguda (GAZZINELLI et al. 1996). Durante a toxoplasmose aguda, IL-10 realiza um duplo papel na supressão da resposta imune tanto de humanos quanto de camundongos. Primeiro, ele inibe a produção de IFN- γ , e possibilita a proliferação de linfócitos T. Segundo, IL-10 pode também desativar macrófagos, através da diminuição da atividade toxoplasmática induzida pelo IFN- γ (BOGDAN & NATHAN 1993; ELLIS NEYER et al. 1997, LANG et al. 2007). Além de IL-10, TGF- β também é um importante desativador de M ϕ (LANGERMANS et al. 2001).

T. gondii, no entanto, não interfere apenas na resposta imune do hospedeiro por induzir a expressão e secreção de citocinas anti-inflamatórias, mas também bloqueia a produção de citocinas pré inflamatórias na fase crônica. A infecção de macrófago peritoneal de camundongo residente e células dendríticas imaturas com *T. gondii* não induz a produção de IL-12 e TNF- α *in vitro* (REIS E SOUSA et al. 1997; BUTCHER et al. 2001; MCKEE et

al. 2004). Em contraste, macrófagos e células dendríticas que foram pré-ativadas e então infectadas são capazes de liberar IL-12 e TNF- α (REIS E SOUSA et al. 1997), explicando a produção dessas citocinas pré-inflamatórias *in vivo* (GAZZINELLI et al. 1993).

Sendo IFN- γ é a principal citocina mediadora da resistência contra o *T. gondii* (SUZUKI et al., 1988), a inibição da sua atividade transcricional pelo parasita intracelular deve ser crucial para sobrevivência intracelular e para estabelecer a persistência da infecção.

A infecção pelo *T. gondii* inibe parcialmente a produção de NO em macrófagos murinos ativados, permitindo a persistência do parasita (SEABRA et al., 2002, 2004; GUILLERMO & DAMATTA 2004). Essa inibição é maior com o aumento da razão *T. gondii*/macrófago. Além disso, parasitas vivos são essenciais para a inibição da produção de NO. Então, a penetração ativa de *T. gondii* é requerida para essa inibição (SEABRA et al., 2002, 2004).

O primeiro mecanismo de evasão descrito do *T. gondii* foi a inibição da fusão lisossomal com o vacúolo parasitofago (JONES & HIRSCH, 1972). Também tem sido demonstrado que o NF- κ B de macrófagos infectados com *T. gondii* não é translocado para o núcleo depois da ativação com LPS (DOBBIN et al., 2002; BUTCHER et al., 2001; SHAPIRA et al., 2002); e o mecanismo de evasão do *T. gondii* relatado para o NF- κ B é dependente do efeito autócrino do TGF- β_1 (SEABRA et al., 2004). O aumento da expressão de Smad 2 e Smad 3 em macrófagos infectados, e a falta de NF- κ B no núcleo, causada pela infecção pelo *T. gondii* são importantes evidências que esse fator direciona a desativação do macrófago através de uma via de sinalização autócrina (SEABRA et al., 2004). NF- κ B é um importante regulador da expressão de genes inflamatórios. A regulação transcricional da iNOS, do gene da iNOS são complexas e não são bem entendidas, mas parecem ser reguladas em parte pelo NF- κ B. NF- κ B inativo é encontrado no citoplasma, ligada a uma de três isoformas de proteínas inibitórias. O complexo ubiquitinado é então proteoliticamente degradado pelo complexo proteossomo 26S, resultando na forma NF- κ B ativa, que é translocado para o núcleo. A expressão da iNOS na glia é dependente de NF- κ B. MG-132 inibe a ativação de NF- κ B, também suprimindo a expressão da iNOS em astrócitos infectados com vírus *Theiler* (DAVIS et al., 2005).

Muitas proteínas têm sido identificadas como principais mediadores intracelulares de sinalização de TGF- β_1 (ROBERTS, 1999). Então a presença de proteínas Smad em macrófagos infectados pelo *T. gondii* é um indicativo do envolvimento de TGF- β_1 (SEABRA et al., 2004). Macrófagos infectados por *T. gondii* secretam TGF- β_1 (BERMUDEZ et al., 1993). A família TGF- β consiste de isoformas (TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3) que são potentes fatores de modulação celular. A secreção do TGF- β_1 é responsável pelo efeito anti-inflamatório e supressão dos efeitos pró-inflamatórios (TSUNAWAKI et al., 1988). Essa substância é um efetivo desativador de macrófago (BONTA & PARNHAM, 1978; ASHCROFT, 1999). Então, o mecanismo que leva a inibição da produção de NO em macrófagos ativados, envolvendo baixa expressão da iNOS, depois da infecção pelo *T. gondii* é uma sinalização autócrina envolvendo a desativação dos macrófagos por TGF- β_1 (SEABRA et al., 2004). Essa desativação do macrófago é uma importante estratégia do parasita para burlar o sistema imune da célula hospedeira, garantindo a disseminação do parasita (SEABRA et al., 2004). Efeitos inibitórios do parasita na expressão da iNOS na microglia ativada com IFN- γ é dependente da produção de TGF- β_1 pela microglia infectada com *T. gondii*, resultando na inibição da produção de NO (ROZENFELD et al., 2005).

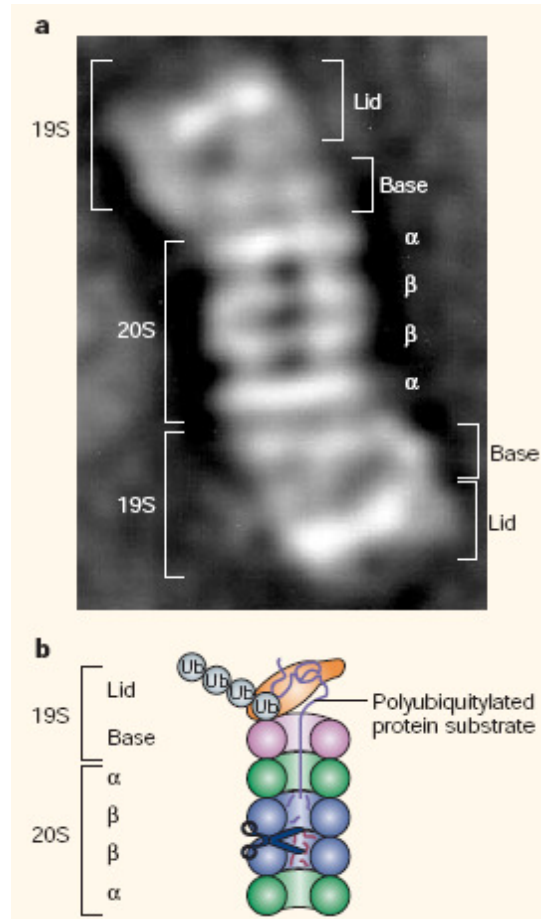
Fosfatidilserina (PS) é um fosfolipídio presente na membrana plasmática e é o principal ligante envolvido na percepção de células apoptóticas por células vizinhas ou macrófagos que as fagocitam. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos induz uma resposta antiinflamatória baseada na ligação de PS ao seu receptor levando a secreção de TGF- β_1 (HUYNH et al., 2002). Tudo indica que o *T. gondii* mimetiza uma célula apoptótica e expõe PS na sua membrana plasmática levando a indução da secreção de TGF- β_1 , com efeito autócrino, síntese de interleucina-10 (IL-10) e inibição da produção de NO pelos macrófagos infectados, resultando na desativação destes macrófagos (SEABRA et al., 2004).

1.4. Proteossomo

Embora muito se saiba sobre síntese e atividade catalítica da iNOS, pouco se conhece sobre o mecanismo de sua degradação. As vias da calpaína e proteossomo-ubiquitina são os principais sistemas proteolíticos responsáveis pela regulação da degradação da iNOS (KONE et al., 2003).

O proteossomo é um complexo enzimático que degrada proteínas poliubiquitinizadas em pequenos peptídeos (PINES & LINDON, 2005; CIECHANOVER, 2005). É composto por dois subcomplexos, um que transmite a atividade catalítica e outro, que é uma partícula regulatória.

A subunidade 26 do proteossomo tem sido identificado como a principal via responsável pela degradação da iNOS (KOLODZIEJSKI et al., 2002). A subunidade 26 do proteossomo é formada pela partícula 20 responsável pela atividade proteolítica e duas partículas regulatórias 19 que são responsáveis pela interação com o substrato (KLOETZEL, 2004) (esquema 7).



Esquema 7: Subunidade 26 do proteossomo (LOWENSTEIN & PADALCO, 2004).

A subunidade 20 degrada proteínas intracelulares e é regulada por complexos protéicos que se ligam a estrutura cilíndrica do proteossomo. Um desses complexos regulatórios, o regulador 11S, conhecido como REG ou PA28, estimula a atividade da peptidase do proteossomo e aumenta a produção de peptídeos antigênicos para apresentação pelo MHC classe I. A ligação do REG causa mudanças conformacionais que abrem um poro na subunidade do proteossomo onde substratos e produtos podem passar (KNOWLTON et al., 1997).

O proteossomo pode ser inibido por muitas drogas, sendo a lactocistina um potente inibidor (GACZYNSKA & OSMULSKI, 2005), reconhecido como altamente específico contra o proteossomo (MUSIAL & EISSA, 2001). Clasto-lactocistina β -lactona é uma reorganização da lactocistina. Apenas clasto-lactocistina β -lactona, e não o seu precursor lactocistina, é permeável a membrana celular. Outra droga também muito utilizada é a MG132, o melhor inibidor conhecido de derivado de aldeído. Na concentração de 50-100 μ M inibe todas peptidases proteossomais. MG132 é usado com frequência em culturas de células quando se necessita de um inibidor barato e reversível (GACZYNSKA & OSMULSKI, 2005).

A ubiquitinação é requerida para ativação de proteínas quinases, mediar interações entre proteínas e marcar proteínas para endocitose (PINES & LINDON, 2005). A cadeia de ubiquitina é reconhecida por receptores no proteossomo e as proteínas são transportadas para a digestão (VOGES et al., 1999). A ubiquitina tem diversas funções celulares, entre elas, a marcação de proteínas para a degradação pelas vias do proteossomo e lisossomal. A ubiquitinação dessas proteínas sinaliza sua proteólise pelo proteossomo (KOLODZIEJSKI et al., 2002).

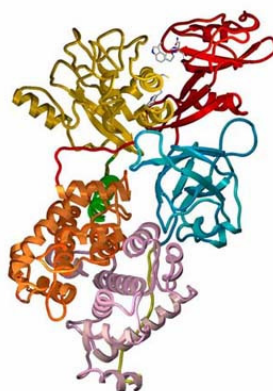
Resultados obtidos com células de rim embrionárias HEK293, células epiteliais de brônquios A549, e macrófagos murinos RAW 264 mostram que a iNOS é sujeita a ubiquitinação e essa é requerida para sua degradação (KOLODZIEJSKI et al., 2002).

Três enzimas estão envolvidas na cascata de conjugação de ubiquitina: E1, enzima ubiquitina de ativação; E2, proteína ubiquitina de conjugação; e E3, ubiquitina ligase. Cada E1 transfere ubiquitina para todas as E2 na célula, e o pequeno repertório de E2 transfere a ubiquitina para ou E3 ou para um resíduo de lisina (PINES & LINDON, 2005).

1.5. Calpaína

Calpaínas são cisteíno-proteinases, não lisossomais, encontradas em todas as células animais. Existem 14 membros da família de genes de calpaína representados no genoma humano (GOLL et al., 2003). A maioria das calpaínas nos tecidos é do tipo μ - ou m-calpaína (esquema 8). Ambos são heterodímeros compostos de subunidades catalíticas e uma pequena subunidade não catalítica, que é requerida para expressão da atividade da proteinase (MELLGREN et al., 2006). Estas proteases têm sido implicadas em funções pró- e anti-apoptóticas. Também tem sido investigado o envolvimento de calpaínas na autofagia (DEMARCHI & SCHNEIDER, 2007). A calpaína pode ser inibida pela calpeptina (MUSIAL & EISSA, 2001).

Estudos com macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS demonstram que dexametasona promove a degradação proteolítica da iNOS, e que o monômero iNOS é um substrato direto para clivagem pela protease de cisteína calpaína I dependente de Ca^{2+} (WALKER et al., 1997).



Esquema 8: Estrutura quaternária da m-Calpaína humana. (STROBL et al., 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Macrófagos são células do sistema imunológico que, quando ativados, produzem NO, um agente microbicida capaz de controlar o crescimento de parasitas intracelulares. Porém, pesquisas recentes têm mostrado que em macrófagos ativados infectados com o *T. gondii* a produção de NO é menor, devido a degradação da iNOS, enzima que catalisa a reação de síntese de NO (SEABRA et al., 2004).

Há dados sobre como o *T. gondii* burla o mecanismo microbicida do macrófago, permitindo sua disseminação. Muito se conhece também sobre a síntese e atividade catalítica da iNOS. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos e vias de degradação da iNOS. Sendo assim, considerou-se necessário estudar as via de degradação da iNOS em macrófagos ativados e infectados pelo *T. gondii*, seguindo, então, o modelo de estudo do nosso grupo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar a via de degradação da iNOS após a infecção pelo *Toxoplasma gondii* em macrófagos ativados.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Confirmar na linhagem de macrófagos J774-A1 a inibição da produção de NO após a infecção pelo *T. gondii*.

3.2.2. Inibir a via do proteossomo e das calpaínas e verificar a expressão da iNOS após infecção pelo *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Macrófagos. A linhagem de macrófago murino J774-A1 foi cultivada em garrafas de 25 cm² com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – Sigma, D1152) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, 12657-029) a 37° C, atmosfera de 5% de CO₂. Atingindo confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando 1 ml de tripsina por poucos segundos e adição de 4 ml de DMEM suplementado com SFB. As células soltas foram centrifugadas a 500g, 10 min, 20° C, ressuspensas em 1ml de DMEM suplementado com SFB, contadas na câmara de Neubauer e plaqueado 1 x 10⁵ células sobre a lamínula redonda na placa de 24 poços com 300 µl de DMEM suplementado com SFB e 3 x 10⁶ por placa de Petri de 10 cm de diâmetro com 10 ml de DMEM suplementado com SFB em cada placa. As células foram ativadas logo após plaqueamento com IFN-γ, Sigma (50U/mL) e LPS (0,1 µg/mL).

4.2. Obtenção de *T. gondii*. *Toxoplasma gondii*, cepa RH, foi mantido por passagens de 2-3 dias na cavidade peritoneal de camundongos suíços. A lavagem peritoneal foi realizada com solução de Hank's. A suspensão foi centrifugada a 50g, 4°C por 10 min, e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 1000g, 4°C por 10 min para concentrar os taquizoítos. Os parasitas foram ressuspensos em DMEM e contados. A infecção foi feita 24h após o plaqueamento dos macrófagos ativados.

4.3. Interação de *T. gondii* com Macrófagos J774-A1 e tratamento com clasto lactocistina β lactona ou Calpeptina. As interações com o *T. gondii* com os macrófagos foram realizadas por 2 e 6h para as imunofluorescências, por 6 e 24h para as dosagens de NO e por 6h para os "westerns" a 37° C, atmosfera de 5% de CO₂ utilizando a proporção de 10:1 protozoários por macrófago contendo ativadores. Os macrófagos foram tratados com clasto lactocistina β lactona, 10µM, inibidor de proteossomo para as imunofluorescências, para os westerns blotting e os dot blotting; ou com calpeptina, 2500 µM, inibidor da calpaína, para dosagem de NO, western blotting e dot blotting por uma hora antes da infecção. Para western blotting e

dot blotting o sobrenadante, contendo algumas células soltas, foi centrifugado a 500g, 10min, 20 °C e as células ressuspensas em 50µl de tampão de lise. A placa foi lavada duas vezes com PBS quente, adicionado 50 µl do coquetel de inibidores de proteases (Sigma, P8340) e então a placa foi raspada, a amostra coletada foi adicionada às células centrifugadas previamente. As amostras foram congeladas no N₂(l) e descongeladas em banho-maria duas vezes e centrifugadas a 14000g, 10min. No sobrenadante coletado foi realizada dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinconínico e foram preparadas amostras contendo 100µg de proteínas.

4.4. Expressão da *iNOS* revelada por imunofluorescência. As lamínulas coletadas foram fixadas por 30min em 3% de formaldeído recém preparado em PBS (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,0), lavadas e incubadas por 20min em 50mM de cloreto de amônio (Merck) em PBS e 10min em 3% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, A3912) em PBS (BSA-PBS). As células foram incubadas por 40min com anticorpo policlonal anti-*iNOS* de coelho (Santa Cruz, sc-8310) diluído 1:100 em PBS-BSA. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com PBS-BSA; incubadas por 30min com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com FITC (Sigma) diluído 1:200 em PBS-BSA, lavado 2 vezes com PBS, montadas em N-propil galacto e observadas no Microscópio Zeiss Axioplan equipado com contraste interferencial, iluminação epifluorescente e lâmpada *de* mercúrio HBO50 (SEABRA et al., 2002). As células foram fotografadas em filme de 400 ASA preto e branco.

4.5. Avaliação de nitrito. A produção de NO foi avaliada indiretamente medindo-se o nitrito nos sobrenadantes coletados com 6, 12 e 24h como descrito (Griess *et al.*, 1982). 50µl do sobrenadante de cada poço foi colocado com um mesmo volume do reagente de Griess (1:1, de 0,1% N-1-nafeti-etilanadamina, Sigma – N-5889, em água destilada e 1% de sulfanilamida, Sigma – S-9251 em 5% de ácido fosfórico, Sigma – P5811) na placa de 96 poços. Com uma absorvância de 540 nm foi medido a concentração de nitrito. A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma

curva padrão pré-calibrada usando nitrito de sódio diluído em DMEM como padrão.

4.6. Dot blotting para obtenção de concentração ideal do anticorpo anti-iNOS. A Amostra obtida como descrito no *item 4.3* foi aplicada na membrana de nitrocelulose e esta bloqueada com tampão bloqueador constituído de 2% de leite desnatado em PBS-tween (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6, tween-20 0,05%) por 2h ou overnight em agitação. A membrana foi lavada (3 x 5 min) com PBS-Tween e incubadas com o anticorpo primário anti-iNOS diluído 1:1000, 1:500 e 1:250 em tampão bloqueador por 3h sob agitação, lavada novamente (3 x 5 min) com PBS-tween e incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho complexado a peroxidase) por 2h sob agitação. A membrana foi lavada (3 x 5 min) com PBS-tween. Posteriormente a membrana foi revelada usando DAB (1mg/ml) e H₂O₂ (1µl/ml).

4.7. Detecção da iNOS por Western blot. As proteínas da amostra obtida conforme o *item 4.3* contendo 100ug foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Um gel não corado contendo as proteínas separadas foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com tampão bloqueador constituído de 2% de leite desnatado em PBS-tween (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6, tween-20 0,05%) por 2h ou overnight em agitação. A membrana foi lavada três vezes por cinco minutos cada lavagem com PBS-Tween e incubadas com o anticorpo primário anti-iNOS diluído 1:500 em tampão bloqueador por 3h sob agitação, lavada novamente três vezes com PBS-tween e incubada com o anticorpo secundário 1:5000 (protína A complexado a peroxidase) por 2h sob agitação. A membrana foi lavada três vezes com PBS-tween. Posteriormente a membrana foi revelada usando DAB (1mg/ml) e H₂O₂ (1µl/ml). A expressão da iNOS foi quantificada por densitometria óptica pelo programa Bozzo & Retamal, 1991.

4.8. Estatística. Foram realizados Testes T Student para observar a significância dos resultados utilizando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Para observação da diminuição da produção de NO em macrófagos ativados e infectados com *T. gondii*, foi realizada a dosagem de NO comparando os valores obtidos em macrófagos infectados ou não. Macrófagos residentes, J774-A1, não produzem óxido nítrico. Macrófagos ativados, da mesma linhagem, quando infectados com o parasita produz menos óxido nítrico que o ativado sem infecção, tanto em 6 quanto em 24h. Esse resultado indica que o *T. gondii* inibe a produção de NO em macrófagos ativados (Tabela 1).

Tabela 1. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados e residentes infectados ou não com *Toxoplasma gondii*.

Macrófagos	<i>T. gondii</i>	Prod. de nitrito (μM) / 6h	Prod. de nitrito (μM) / 24h
Residente	+	0,0	0,0
Residente	-	0,0	0,0
Ativado	+	16,7 \pm 1,88*	26,0 \pm 4,08*
Ativado	-	30,8 \pm 2,09	63,3 \pm 8,90

n=3

P<0,05

*Significativamente diferentes em relação ao valor do macrófago ativado não infectado

Para complementar o resultado da dosagem de NO, foi realizado ensaio de imunofluorescência avaliando a expressão de iNOS de macrófago infectado com *T. gondii*. O macrófago infectado expressa menos iNOS (fig. 1).

A:



B:

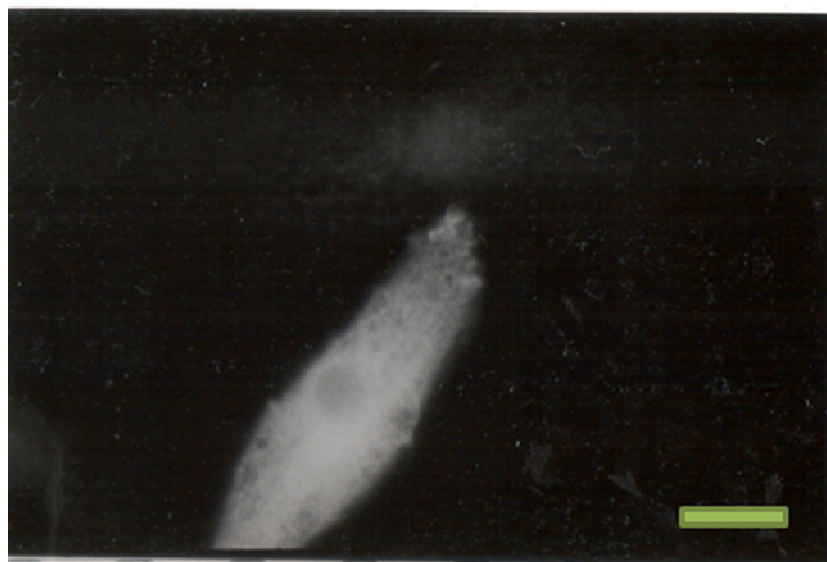


Figura 1. Expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados e infectados com *Toxoplasma gondii* (seta) por 2h.. A. Contraste interferencial, B. Microscopia de fluorescência. Note como o macrófago infectado não expressa iNOS. Barra de calibração: 20 μ m.

Para saber por qual via a iNOS está sendo degradada, avaliamos a produção de NO e a presença da iNOS no citoplasma de macrófagos ativados e infectados com *T. gondii* inibindo duas principais vias de degradação desta enzima: a do proteossomo e a da calpaína. Quando a via do proteossomo foi inibida pela Clasto Lactocistina β Lactona por 2 h, os macrófagos continuaram expressando a iNOS (Figura 2). Macrófagos também tratados por 6 h e infectados apresentam expressão de iNOS, no entanto as células hospedeiras ficaram levemente menos espalhadas (Figura 3).

A:



B:



Figura 2. Expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados tratados com Clasto Lactocistina β Lactona, infectados com *Toxoplasma gondii* (seta) por 2h. A. Contraste Interferencial, B. Microscopia de fluorescência. Note presença da iNOS no macrófago infectado. Barra de calibração: 20 μ m.

A:



B:

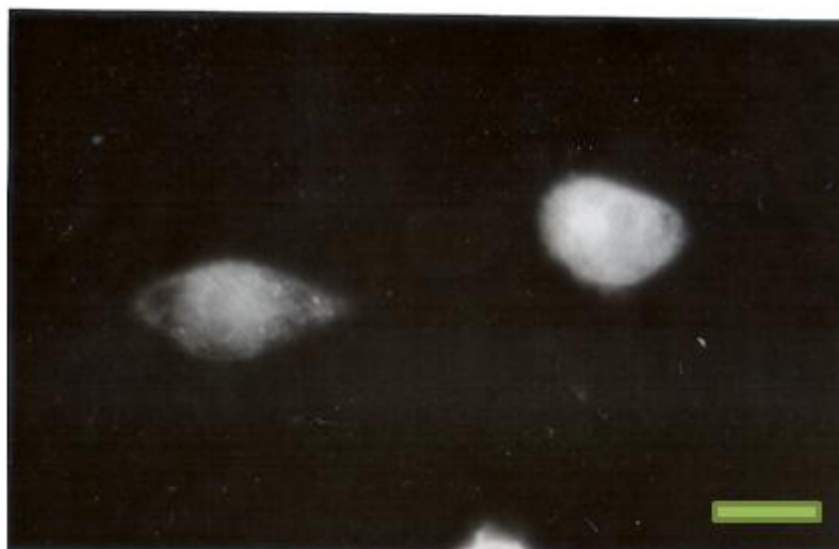


Figura 3. Expressão de óxido nítrico sintase induzida em macrófagos ativados tratados com Clasto Lactocistina β Lactona, infectados com *T. gondii* (seta) por

6h. A. Contraste interferencial, B. Microscopia de fluorescência. Barra de calibração: 20 μ m.

Quando a via da calpaína foi inibida, a infecção continuou provocando a queda da produção de NO (Tabela 2). Macrófagos infectados sem calpeptina produziram menos NO que os macrófagos ativados sem infecção. Quando os macrófagos foram tratados com a calpeptina, os macrófagos infectados continuaram produzindo menos NO que os não infectados, mostrando que a calpaína não está envolvida na degradação da iNOS.

Tabela 2. Dosagem de óxido nítrico de macrófagos ativados, infectados ou não com *Toxoplasma gondii* e tratados com calpeptina ou não.

	Calpeptina	Produção de NO 6h	Produção de NO 24h
Sem <i>T. gondii</i>	+	29,9 \pm 1,26	60,0 \pm 29,21
	-	30,8 \pm 2,09	63,23 \pm 8,90
Com <i>T. gondii</i>	+	16,9 \pm 5,44	30,7 \pm 0,94
	-	16,7 \pm 1,88	26.0 \pm 4,08

n=3

Para confirmar os resultados foi realizado western blotting para detectar a expressão da iNOS em diferentes condições. Para tal, iniciamos com a técnica do dot blotting para verificarmos qual a concentração ideal do anticorpo

primário anti-iNOS. A diluição de 1:500 apresentou marcação suficiente (Figura 4).

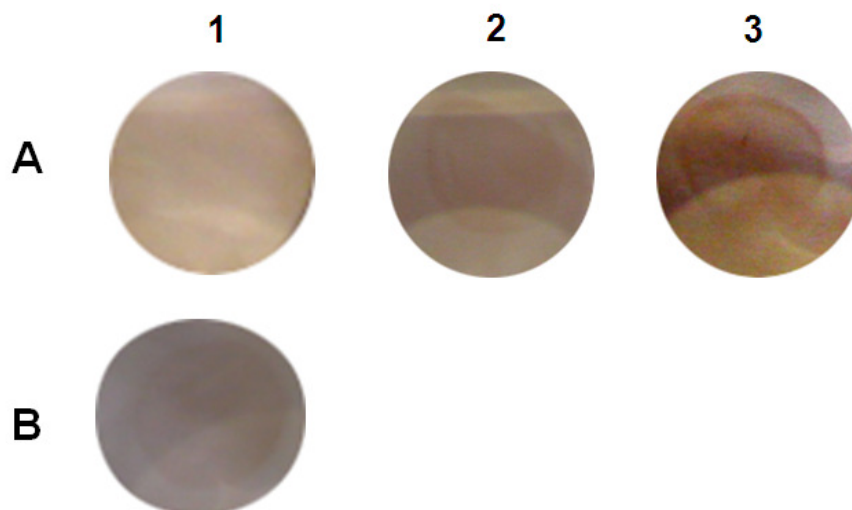


Figura 4. Expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos ativados 24h. 1, 2, 3: Concentração crescente do anticorpo primário anti-iNOS, 1A – 1:1000; 2A – 1:500B; 3A – 1:250. 1B – controle positivo do anticorpo secundário anti-rabbit usando como anticorpo primário anti-*T. gondii* na amostra de macrófagos ativados infectados com o parasita. A: Imagem geral, B: Note 1B marcado, C: Note 2A marcado e 3A mais marcado que 2A.

Foi realizado o western blotting com a concentração ideal do anticorpo primário e detectada a iNOS (fig. 5 A/B). Este resultado confirma os anteriores e demonstram que quando a via do proteossomo é inibida, a expressão da iNOS não é reduzida, ao contrário do que ocorre com os infectados com a via da calpaína inibida. A banda 1, macrófagos ativados, apresenta forte expressão da iNOS. Ao contrário, a banda 2, com macrófagos ativados e infectados com *T. gondii*, expressam menos a iNOS, mostrando que ela está sendo degradada. Na banda 3, macrófagos ativados infectados e tratados com clasto-lactocistina β -lactona, a expressão da iNOS não diminui como na banda 2, mostrando que o proteossomo está envolvido na degradação da iNOS. Porém, na banda 4, macrófagos ativados infectados e tratados com calpeptina, é possível observar

a diminuição da expressão da iNOS, mostrando que a calpaína não está relacionada com a degradação da iNOS.

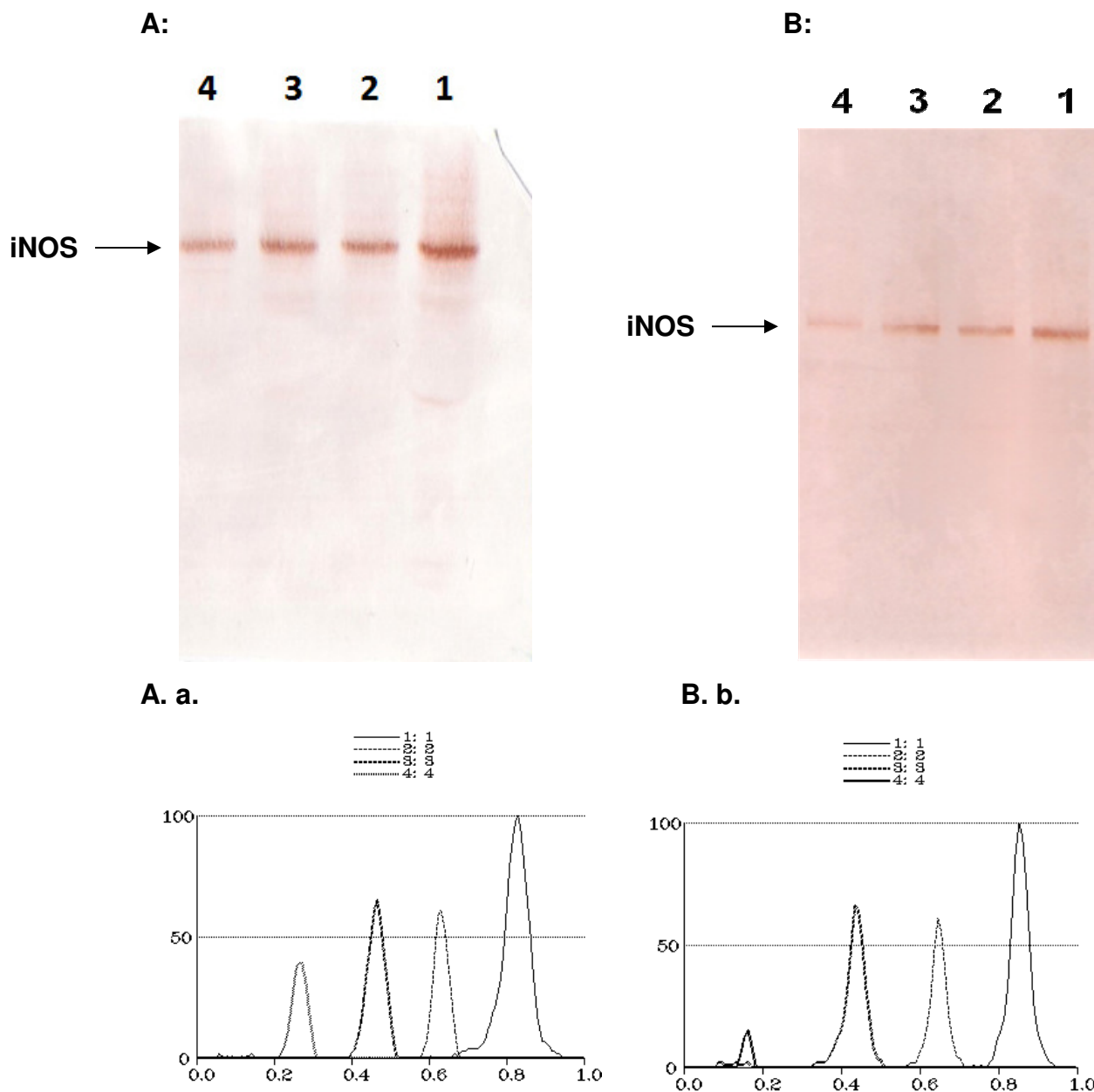


Figura 5. A, B: Detecção da óxido nítrico sintase induzida em cultura de macrófagos em diferentes situações por 6h. 1: Macrófagos ativado (controle); 2: Macrófago ativado e infectado com *Toxoplasma gondii* 6h; 3: Macrófago ativado, tratado com clasto lactocistina β lactona e infectado com *T. gondii*, 4: Macrófago ativado, tratado com calpeptina e infectado com *T. gondii*. A. a.:

Densitometria óptica da fig. A; B. b. Densitometria óptica da fig. B, área total. n=2.

DISCUSSÃO

Macrófagos são células do sistema imune e produzem NO como agente microbicida. Porém, tem sido demonstrado que esse mecanismo é burlado pelo *T. gondii* após a infecção do macrófago ativado, já que se observa inibição da produção de NO através do desaparecimento da iNOS após a infecção (SEABRA *et al.*, 2002; 2004; GUILLERMO & DAMATTA 2004). Para o desenvolvimento de novas terapias contra este parasita é importante entender qual o mecanismo acionado pela infecção que leva ao desaparecimento da iNOS. Aqui demonstramos que a infecção do *T. gondii* inibe a produção de NO na linhagem de macrófago J774, e que o desaparecimento da iNOS é via proteossomo e não via calpaina.

Tem sido demonstrado que a iNOS é regulada e pode desaparecer por 2 vias principais: as vias da calpaína e da ubiquitina-proteossomo. Com a infecção, uma dessas vias deve ser amplificada, degradando a iNOS e consequentemente diminuindo a produção de NO.

A hipótese deste trabalho é que a iNOS é desativada após a infecção do *T. gondii* pela ativação da via do proteossomo, baseado em estudos envolvendo a degradação da iNOS (MUSIAL & EISSA, 2001, KOLODZIEJSKI *et al.*, 2002). Nosso trabalho foi realizado com macrófagos da linhagem J774-A1, e nestas células também se confirmou que após a infecção do *T. gondii*, a produção de NO é inibida. Este resultado indica que o *T. gondii* é capaz de inibir a produção de NO em todas as linhagens testadas até o momento. Quando a iNOS dos macrófagos infectados com o *T. gondii* foi revelada por imunofluorescência constatamos que a enzima desapareceu no citoplasma somente das células infectadas. Quando os macrófagos não foram infectados, a iNOS apareceu de forma clara.

Quando os macrófagos foram tratados com clasto lactocistina β lactona, droga que inibe a via do proteossomo, a expressão da iNOS foi detectada no citoplasma dos macrófagos. A via de degradação da iNOS foi inibida devido ao tratamento com clasto-lactocistina β lactona, já que mesmo bastante infectada,

a célula aparece bem marcada indicando a presença da iNOS. Porém, no tratamento de 6h com a droga, as células já estão mais sofridas, menos espaiadas, devido ao longo tempo de tratamento.

Para confirmarmos os resultados obtidos com a imunofluorescência e a dosagem de NO, foi realizado a detecção da iNOS por western blotting em diferentes situações. Para tal, realizamos previamente um Dot blotting para verificarmos qual a melhor concentração do anticorpo anti-iNOS para realização do western. A concentração 1:500 apresentou marcação suficiente para realização do western. Para termos a certeza que o secundário estava funcionando, usamos uma amostra infectada com *T. gondii* e marcamos com anti-*T. gondii* conhecidamente funcional e foi possível observar marcação mostrando que o secundário está funcionando normalmente.

O western blotting com a concentração correta do anticorpo primário confirma os resultados anteriores e conclui que a iNOS está sendo degradada pela via do proteossomo. A iNOS foi detectada em macrófagos infectados e tratados pela clasto- lactocistina β lactona. Macrófagos ativados sem infecção apresentaram a expressão mais forte de iNOS que os infectados com *T. gondii*. Quando a via do proteossomo foi inibida pela clasto- lactocistina β lactona, mesmo com a infecção, foi possível detectar maior expressão da iNOS quando comparadas com macrófagos infectados. Porém, quando tratados com calpeptina, inibidor da via da calpaína, a iNOS continuou sendo degradada. Este resultado indica claramente que a via da calpaína não está sendo ativada pela infecção do *T. gondii*.

Porém, é possível observar que a expressão da iNOS não é a mesma quando tratada com clasto- lactocistina β lactona e comparada com macrófagos não infectados. Macrófagos não infectados expressam mais iNOS. Isso pode estar acontecendo porque na concentração da droga e no tempo de tratamento utilizado, o proteossomo não foi completamente inibido. Existem trabalhos em que o proteossomo é inibido com o dobro da concentração utilizada, e outros em que o tempo de tratamento é de 20h, muito maior do que o que foi realizado (MUSIAL & EISSA, 2001, KOLODZIEJSKI et al., 2002). Porém, com a confirmação da densitometria óptica e com os resultados da imunofluorescência mostrando que a iNOS permanece no citoplasma de macrófagos infectados e tratados com lactocistina, é possível afirmar que o

proteossomo está envolvido na degradação da iNOS de macrófagos infectados com *T. gondii* e que a via da calpaína não está relacionada com a degradação da iNOS, já que macrófagos expressam menos a iNOS na infecção e tratamento com calpeptina.

Investigar os mecanismos utilizados pelo parasita para burlar o sistema imune, como no caso deste trabalho, inibindo a produção de óxido nítrico através da degradação da iNOS pelo proteossomo, é essencialmente importante e útil para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas, já que a toxoplasmose é uma doença cujo infecta um terço da população mundial (HUNTER et al., 1994; BHOPALE 2003; ROZENFELD et al., 2005).

5. CONCLUSÃO

Podemos sugerir fortemente que macrófagos ativados infectados por *T. gondii* tratados com clasto-lactocistina β lactona tem o proteossomo inativado e apresentam a expressão da iNOS no citoplasma, indicando que a via de degradação da iNOS após a infecção pelo *T. gondii* é a do proteossomo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. O. & HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.** v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADAMS, D. O. Molecular biology of macrophage activation: a pathway whereby psychosocial factors can potentially affect health. **Psychosom. Med.** v. 56, p. 316-327, 1994.
- ALEXANDER, DL, MITAL ,J, WARD, GE, BRADLEY, P, BOOTHROYD, JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathog** v. 1, p. 17, 2005.
- AMBROISE-THOMAS, P, PELLOUX, H. Toxoplasmosis—congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitol Today.** v. 9, p.61–63, 1993.
- ASHCROFT, G. S. Bidirectional regulation of macrophages function by TGF-beta. **Microbes Infect.** v. 1, p. 1275-1282, 1999.
- AUGER, M. J. & ROSS, J. A. The biology of the macrophage. **The Macrophage.** (C. E. Lewis and J. O'D. McGee, eds) IRL Press, New York, NY. P. 1-74, 1992.
- BERMUDEZ, L. E., COVARO, G., REMINGTON, J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. **Infect. Immun.** v. 61, p. 4126-4130, 1993.
- BHOPALE, G.M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** v. 26, p. 213–222, 2003.
- BOGDAN ,C, NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. **Ann N Y Acad Sci** v. 685, p.713–739, 1993.
- BONTA, I. L., PARNHAM, M. J. Prostaglandins and chronic inflammation. **Biochem Pharmacol.** v. 27, p. 1611-1623, 1978.
- BUTCHER, B. A., KIM, L., JOHNSON, P. F., DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* tachzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. **J. Immunol.** v. 167, p. 2193-2201, 2001.
- BUTCHER, B.A., KIM, L., PANOPOULOS, A.D., WATOWICH, S.S., MURRAY, P.J., DENKERS, E.Y. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediate suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. **J. Immunol.** v. 174, p. 3148–3152, 2005.
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.** v. 81, p. 111-122, 2002.
- CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 6, p. 78-86, 2005.
- DAMATTA, R. A., MANHAES, DS. L., SEABRA, S. H., DE SOUZA, W. Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. **Bio Cell.** v. 22, p. 45-52, 1998.

- DARNELL, J. E., JR., KERR, I. M., STARK, G. R. Jak-STAT pathway and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**. v. 264, p. 1415-1421, 1994.
- DAVIS, RL, SANCHES, AC, LINDLEY, DJ, WILLIAMS, SC, SVAPIN, PJ. Effects of mechanistically distinct NF-kappaB inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression. **Nitric Oxide**. v. 12, p. 200-209, 2005.
- DE SERVI, B., LA PORTA, C.A., BONTEMPELLI, M., COMOLLI, R. Decrease of TGF- β 1 plasma levels and increase of nitric oxide synthase activity in leukocytes as potential biomarkers of Alzheimer's disease. **Exp Gerontol**. v. 37, p. 813-821, 2002.
- DEMARCHI, F. & SCHNEIDER, C. The calpain system as a modulator of stress/damage reponse. **Cell Cycle**. v. 6, p. 136-138, 2007.
- DENKERS, E. Y., GIAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinic Microbiol Rev**. v. 11, p. 569-588, 1998.
- DOBBIN, C. A., SMITH, N. C., Johnson. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. **J. Immunol**. v. 169, p. 958-965, 2002.
- DUBEY, J. P., Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc**. v. 189, p. 166-170, 1986.
- DEBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin Microbiol Rev**. v. 11, p. 267-299, 1998.
- DUBREMETZ, J. F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends Microbiol**. v. 27, p. 27-30, 1998.
- ELLIS NEYER, L, GRÜNING, G, FORT, M, REMINGTON, JS, RENNICK, D, HUNTER, CA. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**. v. 65, p. 1675-1682, 1997.
- FERREIRA, MS, BORGES, AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients—a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, p.443-457, 2002.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, S.P., MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as Coccidian oocysts. **Science**. v. 167, p. 893-896, 1970.
- GAO, C., GUO, H., MI, Z., GRUSBY, M. J., KUO, P. C. Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW264.7 murine macrophages. **J. Immunol**. v. 178, p. 1870-1881, 2007.
- GACZYNSKA, M., OSMULSKI, P. A. *Methods in Mol Biol (Ubiquitin-Proteasome Protocols, Editado por: C. Patterson and D. M. Cyr ©)*, 301, Humana Press Inc., Totowa, NJ., 2005.
- GAVRILESCU, L. C., BUTCHER, B. A., DEL RIO, L., TAYLOR, G. A., DENKERS, E. Y. STAT1 is essential for antimicrobial effector function but dispensable for gamma Interferon production during *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun**. v. 72, p. 1257-1264, 2004.
- GAZZINELLI, RT, HIENY, S, WYNN, TA, WOLF, S, SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 90, p. 6115-6119, 1993.
- GAZZINELLI, RT, AMICHAY, D, SCHARTON-KERSTEN, T, GRUNWALD, E, FARBER, JM, SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the

- induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 219, p.127–139, 1996.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., AND CONG, J. The calpain system. **Physiol Rev.** v. 83, p. 731-801, 2003.
- GORDON S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell.** v. 111, p. 927–30, 2002.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** v. 3, p. 23-35 2003a.
- GORDON S. Macrophages and the immune response. *Fundamental Immunology*, ed. W Paul, p. 481–95, 2003b.
- GREEN L. C., D. A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P. L. SKIPPER, J. S. WISHMOK, S. R. TANNENBAUN. Analyses of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. **Anal Biochem.** v. 126, p. 131-138, 1982.
- GUILLERMO, L.V., DAMATTA, R.A. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophages cell lines. **Poult Sci.** v.83, p. 776-782, 2004.
- HESSE, M., MODOLELL, M., LA FLAMME, A.C., SCHITO, M., FUENTES, J.M., CHEEVER AW, PEARCE, E.J., WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol.** v. 167, p. 6533–6544, 2001.
- HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Curr Opin Immunol.** v. 18, p. 49-53, 2006.
- HUNTER CA, LITTON MJ, REMINGTON JS, ABRAMS JS: Immunocytochemical detection of cytokines in the lymph nodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis. **J Infect Dis.** v. 170, p. 939–945, 1994.
- HUYNH, M. L., FADOK, V. A., HENSON, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta 1 secretion and the resolution of inflammation, **J. Clin. Invest.** v. 109, p. 41-50, 2002.
- JOINER, KA, FUHRMAN, SA, MIETTINEN, HM, KASPER, LH, MELLMAN, I. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. **Science.** v. 249, p. 641–646, 1990.
- 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. Med.** v. 136, p. 1173-1194, 1972.
- KAUFMANN SHE, MEDZHITOV R, GORDON S. The Innate Immune Response to Infection. DC:ASM, p. 465, 2004.
- KIM, L., BUTCHER, B.A., DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. **J. Immunol.** v. 172, p. 3003–3010, 2004.
- KNOWLTON, J. R.,JOHNSTON, S. C., WHITBY, F. G., REALINI, C., ZHANG, Z., RECHSTEINER, M., HILL, C. P. Structure of the proteasome activator REGa (PA28a). **Nature.** v. 390, p. 639-643, 1997.
- KOŁODZIEJSKI, P.J., MUSIAL, A., KOO, J.S., EISSLER, N.T. Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation. **Porc Natl Acad Sei USA.** v. 99, p. 12315-12320, 2002.
- KONE, B.C., KUNCEWICZ, T., ZHANG, W., YU, Z. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right

- amount of nitric oxide. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 285, p. F178-F190, 2003.
- LANG, C., GROß, U., LÜDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.** v. 100, p. 191–203, 2007.
- LANGERMANS, JAM, NIBBERING, PH, VAN VUREN-VAN DER HULST, MEB, VAN FURTH, R. Transforming growth factor- β suppresses interferon- γ -induced toxoplasma-static activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor- α production. **Parasite Immunol.** v.23, p. 169–175, 2001.
- LINGELBACH, K, JOINER, KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. **J Cell Sci.** v. 111, p. 1467–1475, 1998.
- LOWENSTEIN, C. J. & PADALCO, E. iNOS (NOS2) at a glance. **J Cell Sci.** v. 117, p. 2865-2867, 2004.
- LÜDER, CG, STANWAY, RR, CHAUSSEPIED, M, LANGSLEY, G, HEUSSLER, VT. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int J Parasitol.** v. 39, p. 163- 173, 2009.
- MACMICKING, J.D., NATHAN, C., HOM, G., CHARTRAIN, N., FLETCHER, D.S, TRUMBAUER, M., STEVENS, K., XIE, Q.W., SOKOL, K., HUTCHINSON, N., CHEN, H., MUDGETT, J.S. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell.** v. 81, p. 641–650, 1995.
- MCKEE, AS, DZIERSZINSKI, F, BOES, M, ROOS, DS, PEARCE, EJ. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** v. 173, p. 2632–2640, 2004.
- MELLGREN, R. L., ZHANG, W., MIYAKE, K., MCNEIL, P. L. Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane. **J Biol Chem.** v. 282, p. 2567-2575, 2006.
- MORDUE, DG, DESAI, N, DUSTIN, M, SIBLEY, LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **J. Exp. Med.** v. 190, p. 1783–1792, 1999.
- MOSSER, D.M & EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.** v. 8, p. 958-969, 2008.
- MUSIAL, A. & EISSA, T. Inducible Nitric-oxide Synthase is regulated by the Proteasome Degradation Pathway. **J. Biol Chem.** v. 26, p. 24268-24273, 2001.
- NATHAN, C. & SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** . v. 97, p. 8841-8848, 2000.
- PINES, J., LINDON, C. Proteolysis: anytime, any place, anywhere? **Nat Cell Biol.** v. 7, p. 731-735, 2005.
- REIS E SOUSA, C, HIENY, S, SCHARTON-KERSTEN, T, JANKOVIC, D, CHAREST, H, GERMAIN, RN, SHER, A. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J Exp Med.** v. 186, p. 1819–1829, 1997.
- ROBERTS, A.B., TGF- β , signaling from receptors to the nucleus. **Microb. Infect.** v. 1, p. 1265-1273, 1999.

- ROZENFELD, C., MARTINEZ, R., SEABRA, S., SANT'ANNA, C., GONÇALVES, J.G., BOZZA, M., MOURA-NETO, V., DE SOUZA, W. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. **Am J Pathol.** v.167, p. 1021-1031, 2005.
- SAEIJ, J.P., COLLIER, S., BOYLE, J.P., JEROME, M.E., WHITE, M.W., BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, p. 324–327, 2007.
- SASMONO, R. T., HUME, D. A. The biology of macrophages. **The Innate Immune Response to Infection**. S.Kaufmann, S.Gordon & R.Medzhitov. Eds. Am. Society for Microbiology Press. p. 71-94, 2004.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T., HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol.** v. 75, p. 163-189, 2004.
- SEABRA, S.H., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. *Toxoplasma gondii* inhibits nitric oxide production by activated mouse macrophages. **Exp. Parasitol.** v. 100, p. 62-70, 2002.
- SEABRA, S.H., DAMATTA, R.A., DE SOUZA, W. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β_1 autocrine effect orchestrating macrophages evasion. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 324, p. 744-752, 2004.
- SHAPIRA, S., SPEIRS, K., GERSTEIN, A., CAAMANO, J., HUNTER, C. A. Suppression of NF-kappa B activation by infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.** v. 185, p. 66-72, 2002.
- SHAPIRA, S., HARB, O.S., MARGARIT, J., MATRAJT, M., HAN, J., HOFFMANN, A., FREEDMAN, B., MAY, M.J., ROOS, D.S., HUNTER, C.A., 2005. Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science.** v. 118, p. 3501–3508, 2005.
- SHER, A., OSWALD, I.P, HIENY, S., GAZZINELLI, R.T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.** v. 150, p. 3982–3989, 1993.
- SIBLEY, L.D., WEIDNER, E., KRAHENBUHL, J.L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Nature.** v. 315, p. 416–419, 1985.
- SIBLEY, L.D, ADAMS, L.B., FUKUTOMI, Y., KRAHENBUHL, J.L. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. **J. Immunol.** v. 147, p. 2340–2345, 1991.
- STUEHR, D.J., MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 82, p. 7738-7742, 1985.
- SUZUKI, Y, REMINGTON, JS. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. **J. Immunol.** v. 140, p. 3943–3946, 1988.
- TAYLOR, P.R., MARTINEZ-POMARES, L., STACEY, M., LIN, H-H, BROWN, G.D., GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.** v. 23, p. 901: 944, 2005.
- TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animal to humans. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1217-1258, 2000.

- TSUNAWAKI, S., SPORN, M., DING, A., NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. **Nature**. v. 334, p. 260-262, 1988.
- VODOVOTZ, Y., BOGDAN, C., PAIK, J., XIE, Q. W., NATHAN, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.** v. 178, p. 605-613, 1993.
- VOGES, D., ZWICKL, P., BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annu. Rev. Biochem.** v. 68, p. 1015-1068, 1999.
- WILSON, C. B., TSAI, V., REMINGTON, J. S. Failure to trigger the oxidative burst of normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. **J. Exp. Med.** v. 151, p. 328-346, 1980.
- YAP, G.S. & SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.** v. 189, p. 1083–1092, 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](#)