

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ
EXTRACELULAR E UTILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii*

DANIELE SEIPEL DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ
EXTRACELULAR E UTILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii*

DANIELE SEIPEL DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Andrea Cristina Vetö Arnholdt

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2009

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ
EXTRACELULAR E UTILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii*

DANIELE SEIPEL DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Biociências e Biotecnologia

Aprovada em 30 de outubro de 2009.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Annelise Wilken de Abreu – FMC
D.Sc. em Biociências e Biotecnologia UENF

Prof. Edésio José Tenório de Melo – UENF
D.Sc. em Ciências UFRJ

Prof. Milton Kanashiro – UENF
D.Sc. em Biociências e Biotecnologia UENF

Prof^a. Andrea Cristina Vetö Arnholdt-UENF
D.Sc. em Ciências UFRJ
Orientadora

"DEDICO ESTA TESE AOS MEUS PAIS
MARILANE E ANTONIO SÉRGIO, AS
MINHAS AMADAS FILHAS LUARA E
SOPHIA, QUE ESTÁ A CAMINHO, E AO
MEU QUERIDO ESPOSO E AMIGO BETO
COM MUITO AMOR E CARINHO"

**"OS QUE ESPERAM NO SENHOR,
ADQUIRIRÃO SEMPRE NOVAS FORÇAS,
TOMARÃO ASAS COMO AS DE ÁGUIA,
CORRERÃO E NÃO SE FADIGARÃO,
ANDARÃO E NÃO DESFALECERÃO"**

ISAÍAS 40: 31

AGRADECIMENTOS:

A Deus, porque acredito que nossa existência pressupõe uma outra infinitamente superior e por me ensinar a receber as bênçãos enviadas com o coração humilde e alegre, compreendendo que és conhecedor de todas as minhas necessidades e que ao seu tempo suprirá cada uma delas;

Ao meu esposo por acrescentar razão e beleza aos meus dias;

Aos meus pais, e demais familiares, amigos e mestres que, pela presença, pela palavra, pelo sorriso ou pela simples lembrança, me deram coragem e determinação para vencer mais uma etapa deste caminho em busca do meu ideal;

A minha filha que esteve sempre ao meu lado com amor e dedicação sempre compreendendo as minhas ausências e me presenteando com palavras, em tempo de falar e com carinhos em tempo de calar;

Aos meus amigos e co-orientados de iniciação científica: Thatiane Lacerda, Pollyana Pimentel, Sara Schuindt e de mestrado: Bruno Cabral, pela agradável convivência, mesmo quando tudo dava errado, sem os quais parte deste trabalho não teria sido executado;

Aos técnicos do LBR em especial a Verônica e aos professores que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho e para a minha formação, os meus sinceros agradecimentos;

Ao prof. Renato Damatta pela revisão criteriosa desta tese e pelo seu auxílio no dia a dia;

Ao prof. Claudio Retamal e sua aluna de mestrado Roberta Fernandes, pela contribuição na caracterização das metaloproteinases de *T. gondii*;

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que pela amizade ou pelo simples convívio me apontaram o caminho nesta árdua trajetória. A todos, o sonho, o abraço, o beijo, o futuro em um universo repleto de esperança.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Reconhecer, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob a orientação da Profa. Dra. Andrea Cristina Vetö Arnholdt

Apoio:

- CNPq Universal 479379/2004-1;
- FAPERJ E-26/170.021/2005;
- CAPES (Bolsa de Doutorado)

SUMÁRIO

Resumo -----	vii
Abstract-----	viii
Abreviaturas-----	ix
1- Introdução-----	17
1.1- Justificativa-----	17
2- Revisão bibliográfica-----	18
2.1- <i>Toxoplasma gondii</i> e seu ciclo biológico-----	18
2.2- Resposta imune ao <i>T. gondii</i> -----	20
2.3- Disseminação do <i>T. gondii</i> pelo hospedeiro e mecanismos de escape a resposta imune-----	22
2.4- Adesão e migração celular no hospedeiro-----	24
2.4.1- Integrinas e seu envolvimento na migração celular-----	25
2.4.2- Processamento de moléculas de superfície celular e vias de ativação da resposta imune ativadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i> -----	27
2.5- Metaloproteinases de matriz extracelular, estrutura, função e regulação-----	30
2.6- Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs), estrutura e função-----	32
2.7- Metaloproteinases e seus inibidores teciduais em processos patológicos-----	33
2.8- Quebra da barreira hematoencefálica em patologias infecciosas-----	34
3- Objetivos-----	37
4- Materiais e métodos-----	38
4.1- Animais-----	38
4.2- Obtenção de <i>T. gondii</i> para infecção <i>in vitro</i> -----	38
4.3- Linhagens celulares-----	39
4.4- Anticorpos utilizados-----	39
4.5- Crescimento e adesão de células Raw 264.7 <i>in vitro</i> -----	39
4.6- Obtenção de células de medula de camundongos e tratamento para diferenciação em macrófagos (BMDM)-----	40
4.7-Tratamento das células <i>in vitro</i> -----	40
4.7.1- Tratamento com LPS-----	40
4.7.2- Infecção com <i>T. gondii</i> -----	41
4.7.3- Tratamento com LPS e infecção com <i>T. gondii</i> -----	41

4.7.4- Tratamento com inibidores de MMPs e de MEKK-----	41
4.7.5- Preparo das células para <i>Western blotting</i> -----	41
4.8- Análise da capacidade de adesão e transmigração de macrófagos <i>in vitro</i> ---	42
4.9- Citometria de fluxo para avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz de membrana e moléculas de adesão após a Infecção com <i>T.gondii</i> --	43
4.10- Extração de proteases do <i>T.gondii</i> -----	43
4.11- Imunoprecipitação de MMP9 do sobrenadante de cultura de células Raw 264.7 e análise de atividade por zimografia-----	44
4.12- MALDI TOFF/TOFF-----	45
4.13- Análise estatística-----	45
5- Resultados-----	46
5.1- Adesão e transmigração de macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i> <i>in vitro</i> -----	46
5.2- Expressão de ERK1/2 quinases em macrófagos murinos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	49
5.3- Adesão de macrófagos tratados com inibidores para as vias MAP quinases, antes ou após a infecção-----	50
5.4- Envolvimento de TLRs na capacidade de migração de macrófagos infectados pelo <i>Toxoplasma gondii</i> -----	53
5.5- Adesão de macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i> Tratados com inibidores de MMPs-----	56
5.6- Transmigração de macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i> em sistema contendo matrigel na presença de inibidor de MMPs-----	58
5.7- Expressão das metaloproteinases de matriz extracelular ADAM10 e MT1- MMP em macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i> -----	62
5.8- Expressão da metaloproteinase MMP9 secretada no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i> -----	65
5.9- Expressão de CD44 na superfície de macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i> -----	66
5.10- Expressão das Integrinas α_v e β_3 em macrófagos murinos infectados com <i>T.gondii</i> -----	69
5.11- Identificação de metaloproteinases em extrato total de <i>T. gondii</i> -----	71
6- Discussão-----	73
7- Conclusão-----	80

ANEXO - Trabalhos publicados

Seipel D, Ribeiro-Gomes FL, Barcelos MW, Ramalho AV, Kipnis TL, Arnholdt ACV. Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability. *APMIS* 2009; 117: 672–680;

Seipel D, Oliveira BCL, Resende TL, Schuindt SHS, Pimentel PMO, Kanashiro MM, Arnholdt ACV. *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. *Veterinary Parasitology*; 2010 IN PRESS.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> -----	20
Figura 2- Superfamília das integrinas-----	25
Figura 3- Modelo de regulação de processos de migração pela modulação da expressão e ou afinidade/avidez de integrinas-----	27
Figura 4- Paradoxo das MMPs em doenças infecciosas-----	34
Figura 5- Entrada facilitada do <i>Toxoplasma gondii</i> em sítios imunoprivilegiados-----	36
Figura 6- Adesão de macrófagos murinos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	47
Figura 7- Viabilidade de células Raw 264.7 desaderidas após a infecção com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	47
Figura 8- Transmigração de células Raw 264.7 após a infecção com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	48
Figura 9 - Expressão de ERK1/2 em macrófagos murinos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	49
Figura 10- Adesão de células Raw 264.7 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> e tratadas com inibidor de MEKK (u0126) antes ou após a infecção-----	51
Figura 11- Porcentagem de macrófagos murinos infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> -----	52
Figura 12- Ensaio de adesão de BMDM deficientes em TLR2 ou CD14-----	54
Figura 13- Ensaio de transmigração de BMDM de camundongos deficientes em TLR2 ou CD14-----	55
Figura 14- Adesão de células Raw 264.7 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> e tratadas com inibidor de metaloproteinases (MMP inibitor 1) -----	57
Figura 15- Células Raw 264.7 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> fluorescente-----	59
Figura 16- Transmigração de macrófagos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> e tratados com inibidor de MMP, através de matrigel-----	60
Figura 17- Transmigração de macrófagos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	61
Figura 18 - Expressão da metaloproteinase transmembrana MT1-MMP-----	63
Figura 19- Expressão da metaloproteinase ADAM-10-----	64
Figura 20- Secreção e atividade de MMP9-----	65

Figura 21- Expressão de CD44 na superfície de células infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> -----	67
Figura 22- Secreção de CD44 e atividade de MMP9-----	68
Figura 23- Expressão das integrinas α v e β 3 por células infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> e tratadas com inibidor de MMPs-----	70
Figura 24- Identificação de MMPs em extrato total de <i>Toxoplasma gondii</i> -----	72
Figura 25- Etapa 1/3 da regulação do complexo de migração da célula hospedeira pelo <i>Toxoplasma gondii</i> -----	82
Figura 26- Etapa 2/3 da regulação do complexo de migração da célula hospedeira pelo <i>Toxoplasma gondii</i> -----	83
Figura 27- Etapa 3/3 da regulação do complexo de migração da célula hospedeira pelo <i>Toxoplasma gondii</i> -----	84
Tabela I - Análise por MALDI TOF-TOF em bando de dados Mascot da principal metaloproteinase de <i>Toxoplasma gondii</i> -----	73

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório capaz de infectar diferentes tecidos do hospedeiro e atravessar barreiras biológicas, alcançando sítios imunoprivilegiados como o cérebro e a retina. O parasito infecta macrófagos e células dendríticas (CDs), utilizando-os para se dispersar pelo corpo, porém, os princípios moleculares desta interação ainda necessitam de uma investigação minuciosa. Neste trabalho avaliamos o envolvimento da maquinaria migratória do hospedeiro na migração de células murinas da linhagem monocítica/macrofágica infectadas com esse parasita. A infecção de macrófagos murinos, com *T. gondii*, diminuiu sua capacidade de adesão após 24h, e aumentou a sua capacidade de transmigração após 48h. Estes macrófagos infectados mostraram aumento na expressão de ERK1/2 e das metaloproteinases de matriz extracelular MT1-MMP e ADAM10. A migração de macrófagos infectados em matrigel foi aumentada após 48h de infecção, e a inibição de metaloproteinases pelo inibidor de MMP tipo I aboliu a migração. O tratamento do parasito antes da infecção, com este inibidor reduziu significativamente a porcentagem de células infectadas, sugerindo que metaloproteinases do *T. gondii* possam estar envolvidas em sua entrada ativa na célula hospedeira. Demonstramos também que o parasito promoveu a liberação de CD44, independente da via de sinalização de ERK, e que a secreção de MMP9 ativa foi aumentada após a infecção. Além disso, o processamento de pro- αv em células infectadas com *T. gondii* parece depender de metaloproteinases de matriz para gerar moléculas funcionais da integrina $\alpha v \beta 3$, sem evidência de uso da via de pro-proteínas convertases. O extrato total do *T. gondii* apresentou atividade gelatinolítica, que quando analisada por MALDI TOF/TOF nos permitiu identificar um peptídeo de massa homóloga a MMP9 de *Notophthalmus viridescens*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; MT1-MMP, ADAM10; MMP9; CD44; integrina $\alpha v \beta 3$ e migração.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that is able to disseminate into deep tissues and cross biological barriers, reaching immunoprivileged sites such as the brain and retina. The parasite is able to infect macrophages and dendritic cells for dispersal throughout the body, but the molecular principles of this interaction are largely unknown. We evaluated the involvement of host invasive machinery in the migration of *T. gondii* infected murine cells from a monocytic/macrophage lineage. We evaluated the role of the invasive machinery of the host cell in migration of infected macrophages. Infected cells presented a diminished adhesion profile after 24h p.i. and a transmigration augmented ability after 48h p.i. Infected macrophages showed increased expression of ERK 1/2 molecule and MT1-MMP and ADAM10 membrane matrix metalloproteinases. Migration of infected macrophages in Matrigel was augmented after 48 hours of infection, and inhibition of metalloproteinases by MMP inhibitor I abolished migration. Treatment of the parasite with this inhibitor prior to the infection significantly reduced the percentage of infected cells, suggesting that parasite metalloproteinases might be involved in active entry. We also demonstrated that *T. gondii* promotes shedding of CD44 independent of the ERK signaling pathway, and that secretion of activated MMP9 is augmented upon infection. Furthermore, processing of pro- αv in *T. gondii* infected cells seems to depend on matrix metalloproteinases to generate functional mature integrin $\alpha v \beta 3$ molecules, with no evidence of proprotein convertase pathway usage. Total *T. gondii* extract exhibited gelatinolytic activity and MALDI TOF/TOFF analysis identified a peptide that presented mass homology to MMP9 *Notophthalmus viridescens*.

Key words: *Toxoplasma gondii*; MT1-MMP, ADAM10; MMP9; CD44; $\alpha v \beta 3$ integrin and migration

ABREVIATURAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida;
APCs- Células Apresentadoras de Antígenos;
BBB- Barreira Hemato-Encefálica (Blood Brain Barrier);
BMDM- Macrófagos Derivados de Medula Óssea (Bone Marrow Derived Macrophages);
BSA- Albumina Sérica Bovina;
CAMs- Moléculas de Adesão Celular;
CCR- Receptor de Quimiocina;
DAB- Diaminobenzidina;
CDs- Células Dendríticas;
DMEM- meio Dulbecco Eagle modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium);
ECM- Matriz Extra Celular;
ERK- Quinase Relacionada a Sinal Extracelular;
GPI- Glicofosfatidilinositol;
GTP- Proteína Trocadora de Guanosina Trifosfato;
HEV- Vênulas de Endotélio Alto;
ICAM- Molécula de Adesão Intercelular;
IL- Interleucina;
i.p.- intra peritoneal;
LFA- Antígeno de Função Leucocitária;
LPS- Lipopolissacarídeo;
MADCAM- Molécula de Adesão Celular Endereçadora de Mucosas;
PK- Proteína Quinase Ativada por Mitógeno;
MC- Malária Cerebral;
MMPs- Metaloproteinases de Matriz Extracelular;
MT-MMP- Metaloproteinase de Matriz Transmembrana;
NK- Matadoras Naturais (Natural Killers);
ON- Óxido Nítrico;
PAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Patógeno;
PBS- Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffer Saline);
PRRs- Receptores Reconhecedores de Padrão;
SDS- Dodecil Sulfato de Sódio;
SFB- Soro Fetal Bovino;

SNC- Sistema Nervoso Central;

TIMPs- Inibidores Teciduais de Metaloproteinases;

TNF- Fator de Necrose Tumoral;

TLR –Receptores Tipo Toll (Toll Like Receptor);

uPAR- Receptor tipo Uroquinase Ativador de Plasminogênio (urokinase plasminogen activator receptor);

VCAM- Molécula de Adesão Vascular;

1- INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose que afeta o gato e a maioria dos vertebrados homeotérmicos (Dubey, 1977; Dubey & Beattie, 1988) e tem como agente etiológico uma única espécie de protozoário, o *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, o maior e mais importante grupo de parasitas intracelulares obrigatórios (Alexander & Hunter, 1998). O *T. gondii* é reconhecidamente um organismo de sucesso; aproximadamente um terço da população mundial é soropositiva para este parasito. A soroprevalência aumenta com a idade e varia no mundo todo (Montoya & Liesenfeld, 2004). O estudo da toxoplasmose tem sua importância pelo fato de ser uma infecção cosmopolita, causar abortos espontâneos ou doença congênita em humanos (Desmots & Couvreur, 1974; Wong & Remington, 1994) e também por constituir-se em uma infecção oportunista crônica que sofre reativação em hospedeiros imunocomprometidos. Neste último grupo incluem-se indivíduos submetidos a transplante de órgão, aqueles que se submetem a quimioterapia do câncer (Israelski & Remington, 1993), e pacientes com AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Luft & Remington, 1992), podendo resultar em quadro meningoencefálico fatal.

1.1- Justificativa

A imunidade gerada ao *T. gondii* não é esterilizante. Cistos contendo bradizoítos permanecem no hospedeiro, localizando-se principalmente em regiões imunologicamente privilegiadas, como o sistema nervoso central (SNC). Em indivíduos imunossuprimidos os cistos são reativados sendo responsáveis pela liberação de bradizoítos que no interior das células convertem-se em taquizoítos levando a encefalite grave. A infecção durante a gestação pode levar a malformação fetal, com manifestações neurológicas e oculares severas. No Brasil, crianças com retinocorioidite congênita apresentam maiores riscos de recorrências múltiplas e em Campos dos Goytacazes-RJ, a população apresenta maior índice de manifestações oculares que em outras regiões do Brasil (Gilbert *et al.*, 2008).

Embora a regulação de MMPs já tenha sido demonstrada em algumas patologias que envolvem a quebra da barreira hematoencefálica (BHE), pouco se tem explorado a respeito do envolvimento destas enzimas na toxoplasmose cerebral. Vários grupos têm demonstrado que o *T. gondii* é capaz de infectar macrófagos,

monócitos, e CDs murinos (Da Gama *et al.*, 2004; Courret *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2006) e utilizá-los como “cavalo de Tróia” para se disseminar pelo hospedeiro, atravessando barreiras biológicas e alcançando sítios imunoprivilegiados como o SNC e a retina. No entanto, as características moleculares desta interação entre as células infectadas e o endotélio da barreira hemato-encefálica não foram investigadas. Metaloproteinases que tem sua expressão aumentada em tumores, como MT1-MMP e a MMP9, são frequentemente associadas com aumento da invasividade em diversos tipos de câncer. Além disso, estas proteases são fundamentais no processamento de grande variedade de moléculas de superfície celular, incluindo CD44 e o precursor da subunidade α_v de integrinas. Portanto a investigação da expressão destas MMPs e da CD44 em células infectadas com o *T. gondii* é relevante para o entendimento da disseminação do parasito para sítios distantes.

A interação do *T. gondii* com as barreiras biológicas é uma característica determinante para a toxoplasmose humana. Portanto, o entendimento dos fatores envolvidos na migração pode revelar outros fatores de virulência do parasito e novos alvos terapêuticos para o combate a doença.

Neste contexto, este estudo visa contribuir para a elucidação das estratégias de escape da resposta imune esterilizante utilizadas pelo parasito, que contribuam para sua adaptação ao hospedeiro, levando a cronificação controlada em sítios imunologicamente privilegiados.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- O *Toxoplasma gondii* e seu ciclo biológico

O *T. gondii* é um protozoário, Coccídeo intestinal do grupo dos felídeos, parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea e família Sarcocystidae. Se multiplica assexuadamente no interior da célula hospedeira, em um compartimento especializado chamado de vacúolo parasitóforo, por fissão binária como uma célula haplóide, ou sexuadamente no intestino do gato com formação de oocistos (Cornelissen *et al.*, 1984). A secreção de proteínas e enzimas, das róprias e das micronemas, organelas específicas do aparelho apical do *T. gondii*, é a chave para o sucesso do seu parasitismo intracelular (Beckers *et al.*, 1994). O *T. gondii* apresenta

três estágios infecciosos: taquizoítos (clones), bradizoítos (cistos teciduais) e esporozoítos (oocistos). O termo taquizoíto refere-se a forma de rápida proliferação do parasito. O bradizoíto é morfológicamente similar ao taquizoíto, porém, multiplica-se lentamente por endodiogenia no interior de cisto no tecido (Frenkel, 1973). O oocisto é um zigoto não esporulado resultante do processo de reprodução sexuada, que só ocorre nas células epiteliais do intestino do gato, onde ocorre a fusão do gameta masculino, microgameta, com o gameta feminino, macrogameta, formando uma estrutura envolta por membrana dupla e rígida, sendo eliminado junto com as fezes. Numa primeira infecção, após 2 - 3 dias de exposição ao ar na temperatura ambiente, os oocistos não infecciosos esporulam produzindo 8 esporozoítos tornando-se altamente infectivos (Dubey *et al.*, 1996).

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno distinguindo-se uma fase em hospedeiro intermediário (aves e mamíferos) e outra em hospedeiro definitivo (felídeos), no qual o ciclo se completa, no epitélio intestinal do animal, através de reprodução sexuada (Aliberti, 2005) (Figura 1). A infecção ocorre pela ingestão de cistos teciduais em carnes cruas ou mal cozidas (Alexander & Hunter, 1998) ou de alimentos e água contaminados com o oocisto (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003) e por infecção transplacentária em gestantes que adquirem a infecção durante a gestação. Na fase inicial aguda, o parasito se divide no interior das células na forma de taquizoítos por endodiogenia até o rompimento da célula, infectando células adjacentes (Kasper & Boothroyd, 1992), podendo ser encontrado em diferentes tecidos, onde provoca uma reação inflamatória constituída essencialmente por células mononucleares causando um pequeno foco necrótico (revisado por Gazzinelli *et al.*, 1993). Na fase crônica da doença, o parasito divide-se lentamente na forma de bradizoítos no interior de cistos teciduais, que se formam devido a uma pressão exercida pela resposta imune do hospedeiro. Estes cistos podem sofrer reativação, levando a liberação dos bradizoítos que se transformam rapidamente em taquizoítos e sua proliferação exacerbada causa danos teciduais (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993).

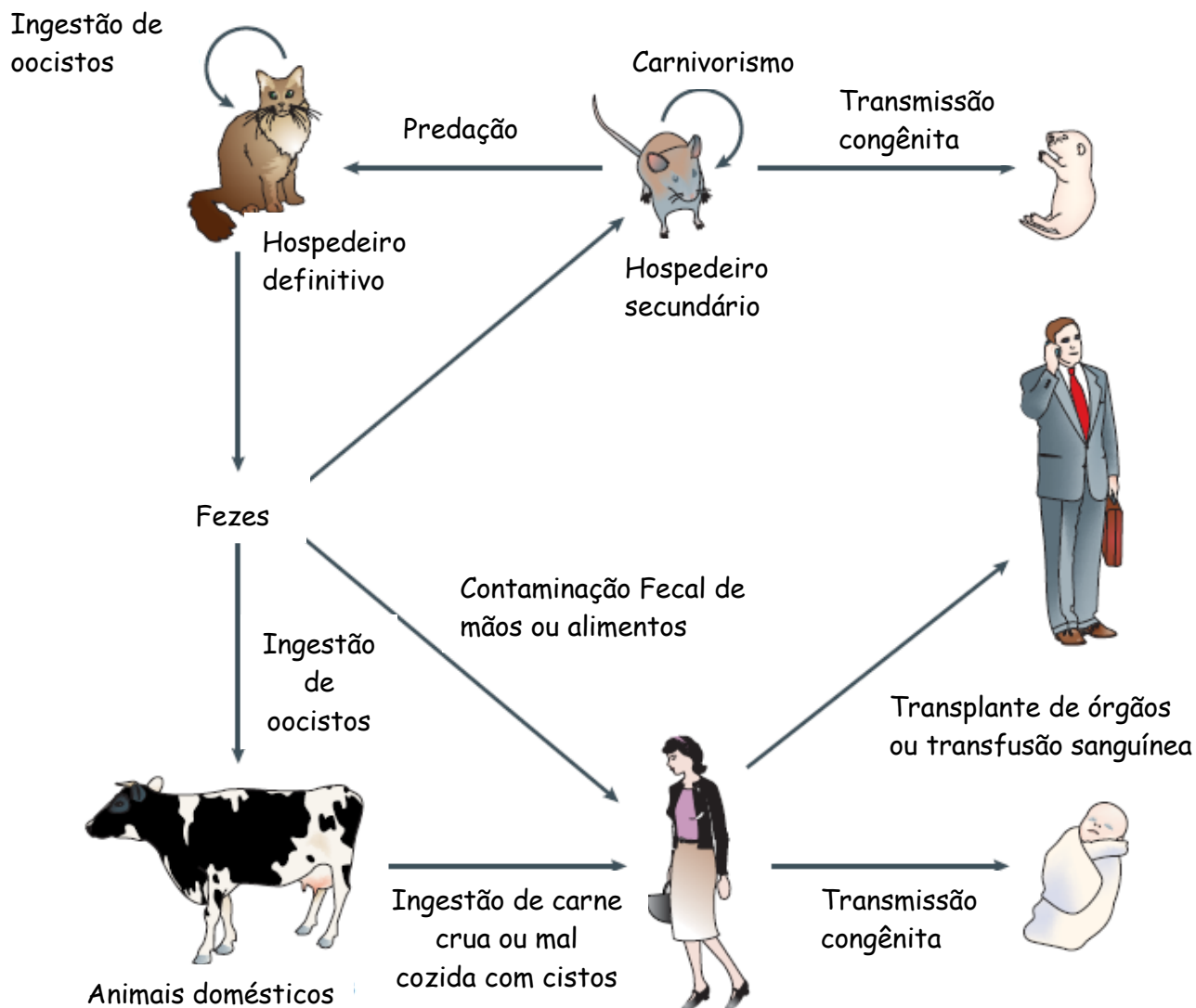


Figura 1- Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*, modificado de Aliberti, 2005.

2.2- Resposta imune ao *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* usualmente parasita o hospedeiro, tanto o intermediário como o definitivo, sem a produção de sinais clínicos. Entretanto, diferenças individuais ou da resposta imune podem resultar em quadros clínicos diversos, alguns podendo até evoluir para consequências graves (revisado por Gazzinelli *et al.*, 1993). Recém nascidos podem apresentar a infecção congênita, que manifesta-se logo ao nascimento ou mais tardiamente. Os sintomas mais frequentes neste tipo de infecção são a coriorretinite em 90% dos casos, seguida de calcificações cerebrais (69%),

perturbações neurológicas (60%) e hidrocefalia (50%). Estes sintomas variam com a fase gestacional em que a mãe adquire ou desenvolve a infecção, sendo mais graves no primeiro trimestre da gravidez (Ray, 1991; Veronesi, 1990).

O desenvolvimento de uma resposta imune protetora a patógenos depende da resposta imune inicial, incluindo a interação entre as células e componentes da resposta imune inata. Parasitos intracelulares possuem grande diversidade de mecanismos de evasão a resposta imunológica.

A resposta imune ao *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Esta variação individual pode ser explicada pelo alto nível de heterogeneidade genética do hospedeiro. Em adição, o *T. gondii* tem a capacidade de se espalhar para todos os tecidos, nos quais os elementos da resposta imune apresentam maneiras diversas de interatividade, particularmente no SNC e na placenta. Além disso, a complexidade aumenta devido a possibilidade de recorrência da infecção com diferentes cepas de *T. gondii* com virulências variadas (Filisetti & Candolfi, 2004). A toxoplasmose congênita foi relatada em bebê de mulher positiva para *T. gondii* e subseqüentemente reinfectada (Fortier *et al.*, 1991). Em estudo realizado em camundongos, por Araújo e colaboradores em 1997, foi relatado alto nível de mortalidade nos camundongos cronicamente infectados com a linhagem ME49 de *T. gondii* e reinfectados com a linhagem C56 ou sua forma variante R-C56.

Em geral, a resposta imune em hospedeiros imunocompetentes desenvolvida no curso da infecção ao *T. gondii*, leva a aquisição de imunidade protetora e caracteriza-se pelo desenvolvimento de forte reação mediada por células, induzida pelo parasito, visto que a imunidade humoral é parcial e temporal. Esta reação leva ao controle da infecção, observando-se o encistamento do parasito e interrupção dos sintomas, quando presentes (revisado por Gazzinelli *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1996; Yap & Sher, 1999). A ruptura periódica dos cistos e a liberação de bradizoítos é o provável fator responsável pela manutenção da imunidade contra o *T. gondii* (Filisetti & Candolfi, 2004).

O *T. gondii* é naturalmente adquirido por via oral em ingestão de cistos ou oocistos, portanto, as células epiteliais e fatores da mucosa do intestino são a primeira linha de defesa contra o parasito. Após a infecção oral experimental com *T. gondii*, o parasito infecta enterócitos no íleo e penetra na barreira epitelial alcançando a lâmina própria e o tecido submucoso, no qual se encontra uma variedade de leucócitos residentes (Barragan & Sibley, 2003; Courret *et al.*, 2005).

Na lâmina própria, o parasito encontra CDs (CD11c+ CD11b+) e macrófagos (CD11c- CD11b+), que uma vez infectadas, podem trafegar do intestino disseminando o parasito para sítios distantes, incluindo o SNC (Courret *et al.*, 2005; Buzoni-Gatel *et al.*, 2006).

A infecção primária com *T. gondii* estimula a produção de altos níveis de IL-12 e IFN γ por células do sistema imune inato, como as células NK “*natural killers*”, macrófagos e CDs. A combinação de efeitos destas duas citocinas é fundamental para a resistência ao *T. gondii* e por serem capazes de disparar uma forte resposta adaptativa Th1 mediada por células T CD4+ e CD8+, as quais também se caracterizam por produzirem altos níveis de IL-12 e IFN γ . Os efeitos destas citocinas pró inflamatórias incluem a produção de moléculas microbidas, como produtos reativos de oxigênio, óxido nítrico (ON) entre outros (revisado por Gazzinelli *et al.*, 1993; Scott & Hunter, 2002).

O controle da reagudização está ligado a presença de TNF α , IFN γ , IL-6, IL-10 e IL-4, num balanço delicado entre a inibição da replicação dos bradizoítos e da amplificação da resposta inflamatória exacerbada, potencialmente deletéria ao hospedeiro (Chao *et al.*, 1994; Gazzinelli *et al.*, 1996; Denkers & Gazzinelli, 1998). A presença de IL-27, citocina capaz de suprimir a diferenciação de células Th17, também parece ser fundamental, uma vez que camundongos deficientes para o receptor de IL-27 tem aumento da resposta de células Th17, as quais estão associadas a inflamação do tecido cerebral após a infecção toxoplásmica experimental (Stumhofer *et al.*, 2006).

2.3- Disseminação do *Toxoplasma gondii* pelo hospedeiro e mecanismos de escape a resposta imune

O estabelecimento da infecção pelo *T. gondii* requer sua penetração ativa nas células epiteliais da mucosa intestinal, mecanismo através do qual este parasita utiliza estruturas celulares especiais, que formam o seu aparelho apical que é o responsável por sua adesão e penetração na célula. Este mecanismo permite ao parasito a sua multiplicação e disseminação pelos diversos tecidos do hospedeiro, com pequeno dano a este, em situações onde haja a preservação do estado imune do indivíduo.

O *T. gondii* é também capaz de atingir sítios imunologicamente privilegiados, como retina e sistema nervoso central, nos quais estabelece cistos teciduais sem a geração de resposta imune inflamatória por parte do hospedeiro. Ao interferir com algumas das ferramentas do sistema imune inato, o *T. gondii* assegura um ambiente apropriado ao seu crescimento, sem provocar o desenvolvimento de patologia severa. *T. gondii* é extraordinariamente capaz de controlar sua sobrevivência através de modulação de muitas das intrincadas vias utilizadas pelo hospedeiro para tentar eliminá-lo (Miller *et al.*, 2009).

Butcher & Denkers demonstraram em 2002, o bloqueio da produção de IL-12 e TNF α por macrófagos infectados quando estimulados com LPS, como consequência da inibição da translocação de NF κ B do citoplasma para o núcleo. O parasito é também capaz de inibir a translocação do fator de transcrição STAT1, levando a uma regulação negativa da expressão de moléculas de classe II (Lang *et al.*, 2006), bem como de reduzir a produção de ON em macrófagos murinos previamente ativados, quando penetram ativamente (Seabra *et al.*, 2002) e que esta redução na produção de NO é dependente da exposição de fosfatidilserina pelo parasito (Seabra *et al.*, 2004).

A disseminação do parasito parece ser extremamente veloz. Após a infecção intraperitoneal Zenner e colaboradores (1998), detectaram maior carga parasitária no baço, nos gânglios linfáticos do mesentério e do diafragma, em apenas dois dias, enquanto no quarto dia já havia parasitos no fígado, pulmões e cérebro. Contudo, não foram detectados parasitos no sangue durante este período da cinética.

Dentre as primeiras células a serem infectadas pelo *T. gondii*, encontram-se os leucócitos intra-epiteliais (Dubey *et al.*, 1997) que poderiam servir como disseminadores do parasito e principalmente, a semelhança de outros organismos, como *Mycobacterium tuberculosis* e a *Salmonella typhimurium*, poderiam promover a travessia da barreira hemato-encefálica através de um mecanismo de entrada facilitada (Dreverts & Leenere, 2002). Para tal, o parasito deve ser capaz de desativar temporariamente algumas funções celulares essenciais para a resposta imune inata e adquirida, como as realizadas pelas CDs e macrófagos (Medzhitov & Janeway, 1997). Macrófagos e CDs são também invadidos pelo *T. gondii*. Estas células possuem um vasto arranjo de receptores de superfície envolvidos no

reconhecimento de patógenos, dando uma especificidade relativa ao sistema imune inato (Medzhitov & Janeway, 1997).

Células apresentadoras de antígenos (APCs) tem alta atividade migratória, e quando encontram estímulos apropriados, como produtos bacterianos, interrompem a migração e tornam-se fortemente aderentes. Esta etapa parece estar relacionada a regulação negativa de $\beta 2$ integrinas, mas dependente de LFA-1 e ICAM-1 (Barrat-Boyes *et al.*, 2000). Permanecendo ativadas no sítio de infecção, as APCs passam a produzir um grupo de quimiocinas responsáveis pela atração de células que contribuem para a resposta imune inata, como MPI-1a, RANTES e MIP-1b (Sozzani *et al.*, 1998). Progressivamente, estas células deixam de expressar receptores para beta-quimiocinas, como CCR1 e CCR5, e adquirem CCR7 que lhes confere a capacidade de responder a MIP-3b, presente nos órgãos linfóides secundários (Sozzani *et al.*, 1998). Assim, a combinação da regulação negativa de moléculas de adesão e de alguns receptores para quimiocinas permitem que APCs ativadas migrem dos sítios periféricos de infecção para os linfonodos onde haverá interação delas com linfócitos T. Somente então ocorre a aquisição da competência estimulatória, com a regulação positiva de moléculas de ativação e de moléculas de adesão, que lhes permitem permanecer nas áreas T dos gânglios linfáticos, por tempo suficiente para o estabelecimento de sinapses imunológicas e o sucesso da ativação da resposta imune primária.

2.4- Adesão e migração celular no hospedeiro

As interações adesivas das células imunológicas são usualmente dinâmicas e transientes. É necessário alto grau de flexibilidade e mobilidade na adesão celular para ampla diversidade de funções, incluindo o monitoramento imunológico e o reconhecimento do antígeno. Linfócitos não estimulados são circulantes e em resposta ao encontro com antígenos ou quimiocinas, se tornam aderentes a outras células e componentes da matriz extracelular (ECM). O mecanismo de migração leucocitária envolve cascatas de interações entre os leucócitos e as células do endotélio vascular. Estas interações envolvem selectinas e seus carboidratos ligantes (interação fraca e reversível) no momento inicial, e em seguida integrinas e moléculas de adesão celular (CAMs), promotoras de forte interação que culmina com o extravasamento dos leucócitos para o tecido (Kinashi, 2005).

2.4.1- Integrinas e seu envolvimento na migração celular

As integrinas são proteínas heterodiméricas formadas pela associação entre uma cadeia alfa e uma cadeia beta, constituindo ao todo aproximadamente 24 integrinas conhecidas em mamíferos (Figura 2). As integrinas são receptores de superfície celular que medeiam a adesão entre células; entre células e a ECM e entre células e componentes do plasma. Devido a suas propriedades adesivas, as integrinas são cruciais para o desenvolvimento e a homeostase de organismos multicelulares (Hynes, 1992). No sistema imunológico as integrinas possuem um papel crucial em vários processos: ligação de leucócitos a células endoteliais e a APCs, morte citotóxica e migração de células para o tecido. Em particular, integrinas que são expressas por leucócitos como a $\alpha_L\beta_2$ - LFA1(antígeno 1 associado a função de linfócito) e a $\alpha_4\beta_1$ - VLA4 (antígeno 4 muito tardio) que são importantes para as propriedades das células imunes, através da ligação a ICAM1, ICAM2, VCAM1 e MADCAM1 (Kinashi, 2005) presentes em vênulas de endotélio alto (HEVs) e endotélio de tecidos inflamados.

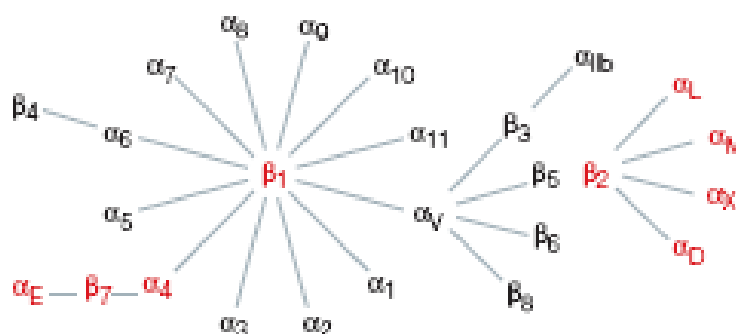


Figura 2: Superfamília das integrinas, formada pelas associações entre os 18 tipos de cadeia α e 8 de cadeias β, constituindo ao todo 24 integrinas conhecidas. Kinashi, 2005.

O arranjo destas moléculas depende do tipo leucocitário em questão e do estado fisiológico desta célula, direcionando-a para diferentes órgãos linfáticos periféricos e eventualmente ao sistema circulatório novamente. Uma vez na circulação células como macrófagos infectados podem atingir capilares do plexo coróide ou das meninges, e assim romper a BHE, em um processo de transmigração (revisado por Worthylake & Burridge, 2001). O envolvimento de integrinas durante a transmigração parece ser sequencial, iniciando-se com $\alpha_4\beta_1$ -VCAM, seguida por $\alpha_{LM}\beta_2$ -ICAM-1 e então $\alpha_V\beta_3$. As integrinas medeiam a adesão ou por sua afinidade ou pela avidéz da

interação dada pela reunião de diversas cópias da molécula agrupadas em domínios de membrana apropriados (*ruffles*) (revisado por Worthylake & Burridge, 2001). Um dos modelos aceites para este processo em cascata propõe, através de diversas evidências experimentais, que a ligação inicial de L-selectina aumenta a adesividade de $\beta 2$ integrinas, além de co-localizá-las no mesmo domínio, pela ação de íons Ca^{++} , MAP quinases e outras tirosina quinases e GTP trocadores. Já o engajamento de $\alpha 4\beta 1$ amplifica a adesividade de $\alpha_{L/M}\beta 2$, seja concentrando-as nos mesmos *ruffles* (o que requer a integridade do citoesqueleto), ou através de proteínas de membranas como a uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*, da família das IAPs) modulando suas funções. Contudo, ocorre uma regulação negativa, demonstrada pelo fato de que a expressão continuada de $\beta 2$ e $\beta 3$ integrinas leva a diminuição da ligação com a fibronectina ou com a VCAM. Da mesma forma, o engajamento de $\alpha_v\beta 3$ diminui a adesividade de integrinas $\beta 2$ (revisado por Worthylake & Burridge, 2001). Vários são os mecanismos de regulação propostos para este *crosstalk* entre as diferentes integrinas, dentre eles, a regulação do tipo *outside-in* envolvendo metaloproteinases e *inside-out* envolvendo MAP quinases (Figura 3).

Por outro lado foi demonstrada pelo nosso grupo a modulação das capacidades de adesão e co-estimuladora de células de linhagens monocíticas murinas e humanas, infectadas pelo *T. gondii*. Os dados obtidos neste trabalho evidenciam uma regulação negativa de moléculas de adesão importantes como $\alpha 4$, $\alpha 5$, α_v , α_L e $\beta 2$ em macrófagos murinos; e $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\beta 2$ em monócitos humanos, induzida pelo *T. gondii* (Da Gama *et al.*, 2004). Esta regulação é temporal, e após 48h de infecção ocorre um aumento gradativo da expressão de $\alpha 4$ e α_v e recuperação da expressão de $\beta 2$. A expressão das moléculas co-estimulatórias CD86, CD83, CD1a e HLA-DR foi similar entre monócitos humanos infectados com *T. gondii* e o grupo controle, enquanto que a expressão de CD14 diminuiu. A expressão de CD80 aumentou em macrófagos humanos infectados com *T. gondii* (Seipel *et al.*, 2009).

Esta modulação negativa reflete-se na capacidade destas células em aderir ou manterem-se aderidas aos componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno IV, laminina e fibronectina. No entanto, esta inibição da adesão restringe-se também as primeiras horas de infecção, uma vez que após 24h ocorre a retomada da capacidade de adesão dos macrófagos infectados. Estes eventos são dependentes da penetração ativa (Da Gama *et al.*, 2004), e sabe-se que parasitos

recobertos de laminina utilizam-se de integrinas na etapa de adesão (Furtado *et al.*, 1992), e que posteriormente durante a entrada e formação do vacúolo parasitóforo são excluídas proteínas de membrana como ICAM-1 e CD44 (Mordue *et al.*, 1999). Possivelmente estes mecanismos contribuam, em parte, para a diminuição das moléculas em questão (Seipel *et al.*, 2009). O envolvimento de metaloproteinasas nesta regulação ainda requer uma avaliação minuciosa.

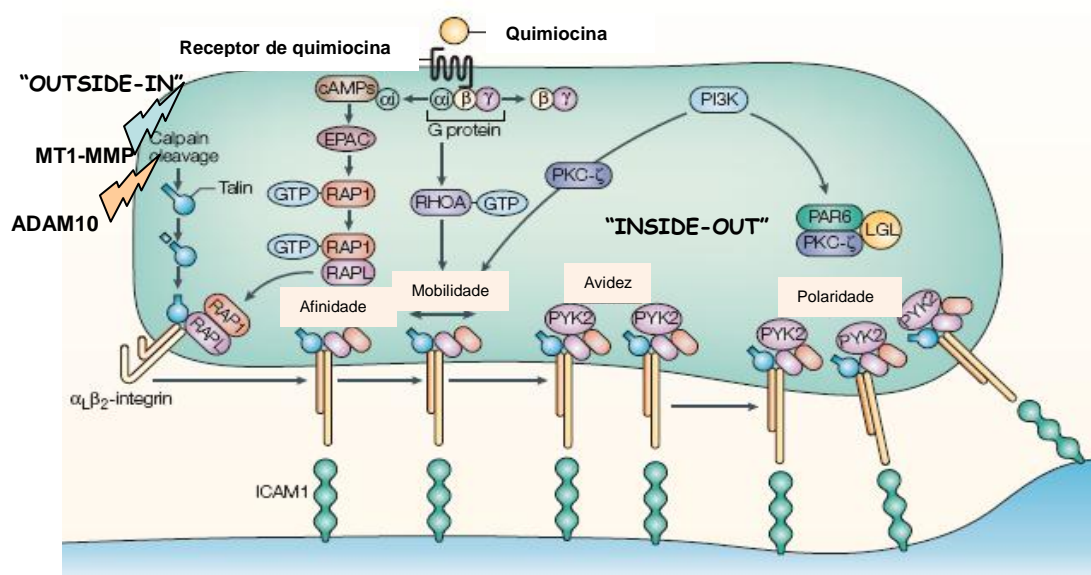


Figura 3- Modelo de regulação de processos de migração pela modulação da expressão e ou afinidade/avidez de integrinas. Estão representados mecanismos *outside-in* de sinalização, destacando-se a ação das metaloproteinasas sobre as integrinas, e mecanismos *inside-out*, destacando-se a ação de MAP quinases ERK, ativadas pela via RAP1. Modificado de Imhof & Aurrand-Lions, 2004.

2.4.2- Processamento de moléculas de superfície celular e vias de ativação da resposta imune ativadas pelo *Toxoplasma gondii*

A ativação de várias células do sistema imune é iniciada através do reconhecimento de estruturas específicas ou ligantes na superfície do parasito (Kawai & Akira, 2005). Estes PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) apresentam três características principais: i) não são expressos pelas células do hospedeiro; ii) são altamente conservados e iii) a expressão é essencial para a sobrevivência do patógeno (Gazzinelli & Denkers, 2006). A ligação destes PAMPs

pelos receptores reconhecedores de padrão (PRRs) na superfície de células imunes dispara vias de sinalização intracelular, que resultam na indução da resposta imune (Kawai & Akira, 2005). Os receptores incluem TLRs (receptores tipo-Toll), receptores *scavenger* e lectinas tipo-C, com os TLRs desenvolvendo um papel central (Yarovinsky & Sher, 2006), especialmente com relação a crítica iniciação da produção de IL12, e subsequente produção de IFN γ e a clássica ativação dos macrófagos em repouso. Os TLRs são cruciais para o reconhecimento de patógenos intracelulares. Todos os TLRs tem domínios amino-terminais ricos em leucina que reconhecem os PAMPs e um domínio receptor Toll-interleucina I carboxi-terminal (TIR) que inicia a sinalização intracelular (Kawai & Akira, 2005).

A ligação de um ligante ao seu receptor TLR tipicamente estimula a atividade pro-inflamatória, a qual protege o hospedeiro da invasão do patógeno. Um exemplo típico deste evento é a ativação de TLR4 por LPS de bactérias Gram-negativas, resultando na rápida indução de uma resposta inflamatória intensa (Beutler, 2000). Após a ligação aos PAMPs, os TLRs se associam com uma proteína adaptadora de diferenciação mielóide (MyD88), e membros da família das quinases associadas a receptor IL1(IRAK), o complexo formado inicia uma cascata de fosforilação e acoplamento de outras proteínas de ligação no citoplasma. A TAK1 ativada inicia a ativação da via do fator de transcrição NF κ B e das vias de proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPK). A ativação destas vias resulta na produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas associadas com a resposta a infecção com patógenos intracelulares (Kawai & Akira, 2005).

Estudos utilizando camundongos silenciados para a expressão do gene da MyD88 tem demonstrado a importância dos TLRs na resistência inata ao *T. gondii*. Estes animais são tão susceptíveis a infecção com uma linhagem pouco virulenta, quanto os animais silenciados para o gene da IL-12. Em adição ao aumento da parasitemia, camundongos silenciados para o gene da MyD88 mostram acentuada redução na produção de IL-12 por macrófagos, neutrófilos e CDs (Scanga *et al.*, 2002).

As MAPKs são uma família de proteínas quinases que incluem a quinase relacionada a sinal extracelular (ERK), p38 MAPK e proteína quinase ativada por estresse/ quinase c-Jun N-terminal (SAPK/JNK) e são ativadas através da ligação do patógeno aos TLRs (Denkers *et al.*, 2004). A via ERK de sinalização desempenha papel essencial na indução da motilidade celular. Tanimura e colaboradores

demonstraram em 2003, que maior ativação de ERK1/2 foi comparável a maior habilidade de invasão em matrigel em várias linhagens de células tumorais humanas e que esta ativação tem sido relacionada a expressão do gene de MMP9, cuja atividade é requerida para a motilidade celular.

Existem amplas evidências que sugerem que o *T. gondii* subverta a cascata de sinalização do NFκB, particularmente no início da infecção. Uma molécula do parasito candidata a esta modulação é a TgHSP70, a qual tem sido implicada no bloqueio da função/translocação do NFκB (Dobbin *et al.*, 2002) e aumento da susceptibilidade a infecção com *T. gondii* (Ahmed *et al.*, 2004). A HSP70 de mamíferos possui um sinal de translocação nuclear e poderia, portanto, competir com o NFκB para acesso ao complexo núcleo-poro (Feinstein *et al.*, 1997)

Assim, os macrófagos que inicialmente tem parte de suas funções desligadas, funcionariam como “cavalos de Tróia”, levando num segundo momento, os parasitos da infecção a alojarem-se em sítios imunologicamente privilegiados, no qual uma resposta anti-inflamatória diferenciada os manteria em cistos, garantindo assim a sua permanência no hospedeiro mamífero. Vários grupos dentre os quais, Da Gama *et al.*, 2004; Courret *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2006, têm demonstrado que o *T. gondii* é capaz de infectar macrófagos, monócitos, e CDs murinos e a utilizá-los como “cavalo de Tróia” para se disseminar pelo hospedeiro.

A migração é um processo composto por muitos passos envolvendo metaloproteinases que são capazes de degradar componentes da ECM, para promover a ativação cruzada de pro-MMPs e processar várias moléculas associadas a superfície incluindo integrinas e CD44 (Itoh & Seiki, 2004; Stefanidakis & Koivunen, 2006). O CD44 pertence a uma classe de glicoproteínas transmembrana do tipo I que estão envolvidas na interação célula-célula e célula-matriz, ligando a hialurona a osteopontina (Rangaswami *et al.*, 2006), e participam de muitos processos celulares como: crescimento, sobrevivência, diferenciação e mobilidade. A CD44 e a integrina $\alpha 4\beta 1$ formam um complexo na superfície celular e funcionam como uma âncora para a pro-MMP-9 (Redondo-Muñoz *et al.*, 2008), uma MMP secretada que está envolvida no comportamento invasivo da célula. A polimerização de filamentos de actina modula a expressão de CD44 na superfície celular e sua disponibilidade para formar complexo com a MMP-9. A liberação do ectodomínio de CD44 inicia a degradação da ECM através de MMP-9 (Samanna *et al.*, 2007). Estas moléculas formam complexos na superfície celular em domínios *raft* (Cayrol *et al.*, 2008), e em

células cancerosas encontram-se mais expressas e compõem a maquinaria invasiva destas células durante a metástase.

2.5- Metaloproteinasas de matriz extracelular, estrutura, função e regulação

O sucesso para eliminação de infecções pelo hospedeiro requer o influxo de células efectoras, a morte do patógeno, a contenção da inflamação e finalmente o remodelamento da ECM, processos estes, no qual as metaloproteinasas de matriz (MMPs) derivadas do hospedeiro desempenham um papel central (revisado por Elkington *et al.*, 2005).

As MMPs constituem uma família de proteases (endopeptidases) dependentes de zinco, que incluem as proteínas com domínio desintegrina e metaloproteínase (ADAMs). Elas são expressas no desenvolvimento embrionário, em processos fisiológicos e patológicos, e em resposta a infecções (Sternlicht & Werb, 2001). O papel das MMPs em processos fisiológicos normais tem sido descrito no desenvolvimento embrionário, no ciclo menstrual, no remodelamento ósseo e em doenças nas quais a renovação da ECM é anormal, como na artrite, nos tumores invasivos e na aterosclerose (Brinckerhoff & Matrisian, 2002).

Embora as MMPs tenham sido consideradas inicialmente, simplesmente como enzimas que remodelam a ECM, suas funções tem sido expandidas para múltiplos mecanismos de imunomodulação, como por exemplo, a clivagem de citocinas com aumento ou inibição de suas funções (revisado por Elkington *et al.*, 2005). Geralmente as MMPs possuem três domínios estruturais: um domínio pro-peptídeo N-terminal, um domínio interno catalítico que contém cisteína e um domínio C-terminal tipo-hemopexina (exceto as MMP-7 e -26) (Bode *et al.*, 1999; Visse & Nagase, 2003). As MMPs são classificadas pela sua especificidade ao substrato em: collagenases (MMP-1, -8 e -13); gelatinases (MMP-2 e -9); estromelisina (MMP-3, -10, -11); elastases (MMP-7, e -12); MMPs de membrana (MT-MMPs, MT-MMP-14, -15, 16 e -17), as quais são ancoradas por um domínio transmembrana ou através de âncoras de glicosil-fosfatidilinositol (revisado por Elkington *et al.*, 2005). O domínio catalítico é altamente conservado e determina a especificidade ao substrato (Brinckerhoff & Matrisian, 2002).

As ADAMs constituem uma família de MMPs a parte, elas são proteínas transmembrana ligadas as integrinas, importantes na sinalização intracelular e

adesão celular (Blobel, 2000), também são MMPs, constituindo uma família a parte. As subunidades das ADAMs compreendem um domínio catalítico no final da extensão extracelular, que se subdivide em três outros domínios: um domínio desintegrina, um domínio rico em cisteína e domínios repetitivos de fator de crescimento epidermal. A cauda citoplasmática ligada ao domínio de fator de crescimento epidermal é projetada através da membrana e sinaliza eventos da superfície celular para o citoplasma (Yong, 2005). O domínio desintegrina liga-se a integrinas e sua região rica em cisteína interage com os proteoglicanos. A região catalítica das moléculas de ADAM liberam proteínas da ECM e da superfície celular através de um processo chamado liberação do ectodomínio, como na geração de CD44 solúvel.

Vários exemplos importantes da função das ADAMs no SNC incluem o processamento da proteína precursora amilóide e do fator transformador de crescimento alfa (TGF- α). ADAMs estão envolvidas na proliferação celular, diferenciação, e sobrevivência, assim como no crescimento axonal e mielinização (Cauwe *et al.*, 2007). A ADAM10 é possivelmente uma α -secretase que cliva a proteína precursora amilóide; ADAMs 13 e 17 (também conhecidas com enzimas conversoras de TNF- α ou TACE) ativam TNF (Gearing *et al.*, 1994).

Devido a sua atividade enzimática, as MMPs podem causar danos aos tecidos, sendo, portanto, fortemente reguladas em múltiplas etapas. Elas raramente são estocadas, mas tem a sua transcrição gênica para secreção dirigida, aumentada em células estromais e inflamatórias em resposta a estímulos exógenos e citocinas inflamatórias como TNF α e IL-1 β (Unemori *et al.*, 1991). As exceções são as MMP-8 e -9 neutrofílicas, que podem ser secretadas imediatamente sempre que necessário (revisado por Elkington *et al.*, 2005).

As MMPs são secretadas na forma de pró-enzimas ou zimogênio, que são posteriormente ativadas por clivagem proteolítica, com liberação de um resíduo de cisteína do domínio catalítico do pro-peptídeo (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Após a secreção as MMPs são compartimentalizadas na matriz próximas as células (Brooks *et al.*, 1996; Dumin *et al.*, 2001) e sua atividade é regulada por secreção de inibidores específicos, os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), os quais se ligam de forma não covalente ao domínio catalítico (Brew *et al.*, 2000).

Adicionalmente, a sinalização que dependente de contato celular poderia aumentar a expressão de MMPs (Lacraz *et al.*, 1994; Miltenburg *et al.*, 1995). A

secreção destas enzimas pode ser diminuída por diversas citocinas incluindo $IFN\gamma$, IL-4 e IL-10 (Wahl *et al.*, 1990; Corcoran *et al.*, 1992; Mertz *et al.*, 1994), embora a regulação da secreção seja célula e estímulo específica. Intracelularmente, as vias principais de transdução de sinal envolvem as MAPK e a prostaglandina E2 (Reunanen *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2003).

2.6- Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs), estrutura e função

As TIMPs são proteínas que constituem um sistema proteolítico que participa não apenas da quebra dos componentes da ECM e subsequente remodelamento do tecido, mas também providencia um importante papel regulatório no microambiente celular (Noel *et al.*, 2008). Esta família é composta por quatro membros com alta homologia de sequência e identidade estrutural, mas com diferentes expressões teciduais, regulação e características inibitórias (Melendez-Zajgla *et al.*, 2008).

A família das TIMPs de mamíferos é constituída por pequenas proteínas enzimáticas com massa molecular entre 21 e 28 kDa. Estas enzimas são codificadas por genes altamente conservados e tem sobreposição de funções. Elas são compostas basicamente por dois domínios estruturais: um domínio N-terminal consistindo de seis resíduos cisteína conservados formando três pontes dissulfeto, os quais possuem atividade inibitória de MMP e um domínio C-terminal que também contém seis resíduos cisteína conservados, formando três pontes dissulfeto (Stetler-Stevenson, 2008). Essa família de enzimas apresenta função inibitória contra a maioria das MMPs, com algumas predileções: TIMP-1 inibe principalmente a MMP-9 e a TIMP-2 inibe MMP-2 e paradoxalmente contribui para a ativação de pro-MMP-2, após a formação de complexo trimolecular com pro-MMP2 e a MT1-MMP, também conhecida como MMP14. A TIMP-3 é a única ligada a matriz extracelular, inibindo várias proteinases responsáveis pela clivagem de ectodomínios de proteínas de membrana, desempenhando, portanto, um importante papel no crescimento e morte celular e no reparo tecidual (revisado por Rosenberg, 2009).

Embora os quatro membros da família das TIMPs sejam muito similares na estrutura, elas apresentam diferenças marcantes no seu padrão de expressão. Enquanto a expressão da TIMP-2 é constitutiva e ubíqua, a expressão das TIMP-1, -3 e -4 é induzida e tecido específica. A TIMP-1 é principalmente expressa

no sistema reprodutivo; TIMP-3 no coração, rins e timo, e TIMP-4 no coração, rins, pâncreas, cólon, cérebro e tecido adiposo (Greene *et al.*, 1996).

2.7- Metaloproteinases e seus inibidores teciduais em processos patológicos

A expressão da maioria das MMPs é normalmente baixa ou ausente em tecidos saudáveis, sendo induzidas quando é necessário o remodelamento de um tecido, durante a inflamação ou em processos patológicos (Figura 4).

A secreção apropriada de MMPs faz parte de uma resposta imune efetiva, entretanto a atividade excessiva das MMPs devido ao aumento na sua secreção ou decréscimo na secreção de TIMPs pode causar danos teciduais no hospedeiro. A destruição do tecido pode favorecer a disseminação ou persistência do patógeno, através da quebra de barreiras imunológicas, em sítios que são pobremente acessados pelas células imune do hospedeiro como o SNC (revisado por Elkington *et al.*, 2005; Reijerkerk *et al.*, 2006).

O LPS bacteriano inicia uma ativação descontrolada do sistema imune inato, conhecido como choque endotóxico. A falha dos órgãos é associada com o aumento da permeabilidade e as MMPs podem contribuir para a quebra da barreira endotelial. O colágeno tipo IV é o componente primário da membrana basal endotelial e é degradado por MMPs; o espalhamento do colágeno degradado compromete a barreira endotelial e resulta na síndrome sistêmica do choque tóxico e falha múltipla de órgãos. O LPS é conhecido por regular positivamente a secreção das MMP-1, -7 e -9 por monócitos e macrófagos (Welgus *et al.*, 1990; Campbell *et al.*, 1991; Busiek *et al.*, 1995) e a liberação de MMP9 por neutrófilos (Opdenakker *et al.*, 1991). A cascata inflamatória pode ser exacerbada por catecolaminas liberadas no choque séptico amplificando a produção de MMP9 por monócitos (Speidl *et al.*, 2004). A endotoxemia causada por LPS em camundongos induz a expressão de múltiplas MMPs e causa aumento da atividade gelatinolítica nos órgãos afetados. Doses letais de LPS permitem uma maior e mais prolongada expressão gênica de MMPs já ativadas, assim como induz a expressão de novos genes de MMPs em todos os órgãos (Pagenstecher *et al.*, 2000).

Em pacientes com choque endotóxico, os níveis séricos de MMP9 são diretamente relacionados a severidade da doença (Pugin *et al.*, 1999) e aumento nos níveis de MMP9 são encontrados no lavado de fluido broncoalveolar de

pacientes com síndrome respiratória aguda, uma das principais complicações da endotoxemia (Torii *et al.*, 1997).

A importância funcional da atividade de MMP foi sugerida pela observação feita em camundongos deficientes em MMP9, que tiveram a mortalidade reduzida no choque endotóxico quando comparados aos camundongos selvagens (Dubois *et al.*, 2002). Além disso, a ausência de inibidores de MMPs é desvantajosa, como demonstrado em camundongos deficientes em TIMP-3, que tiveram patologia pulmonar exacerbada, quando comparada aos animais selvagens no modelo de sepsis induzida (Martin *et al.*, 2003).

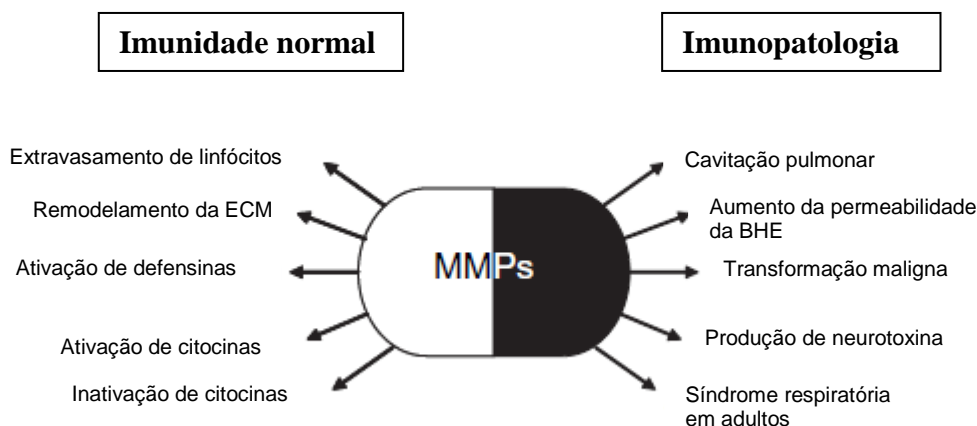


Figura 4- Paradoxo das MMPs em doenças infecciosas. Modificado de Elkington *et al.*, 2005).

2.8. Quebra da barreira hematoencefálica em patologias infecciosas

A BHE protege o cérebro da entrada de moléculas e células circulantes que podem perturbar o microambiente neuro-parenquimal. Esta barreira consiste de células endoteliais altamente especializadas que estão conectadas por junções compactas (Reijerkerk *et al.*, 2006). A injúria na BHE está envolvida em muitos processos infecciosos. Vários estudos têm demonstrado que alterações nas junções compactas das células endoteliais da BHE por MMPs são fenômenos comuns em doenças neurológicas incluindo: encefalites (Dallasta *et al.*, 1999), esclerose múltipla (Kirk *et al.*, 2003; Plumb *et al.*, 2002), meningite bacteriana, na qual a principal causa da patologia é o extravasamento de células inflamatórias (Del Maschio *et al.*, 1999);

e na demência associada a HIV (Boven *et al.*, 2000). Monócitos infectados com HIV *in vitro*, tiveram um aumento na secreção de MMP9, atividade da qual resultou em aumento da permeabilidade da monocamada de células endoteliais, a qual explicaria o aumento da permeabilidade da BHE que ocorre na infecção com HIV (Dhawan *et al.*, 1995).

Proteases extracelulares, incluindo MMPs, desempenham papel importante na abertura da BHE e subsequente influxo de células para o cérebro (Figura 5), incluindo as infectadas por parasitas protozoários como no caso da malária (Yong *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 2002).

A malária cerebral (MC) é causada pelo sequestro de eritrócitos infectados para dentro do cérebro, após injúria na BHE. Van den Steen e colaboradores demonstraram em 2006, o aumento no número de células expressando a MMP-9 (gelatinase) no cérebro de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA que desenvolveram a MC, mas não no cérebro de camundongos que foram infectados com a forma do parasito que não induz esta manifestação clínica. Além disso, foi detectada atividade gelatinolítica *in situ* no endotélio dos vasos sanguíneos do cérebro dos animais com MC. Na tuberculose cerebral (SNC-TB), que é a mais severa forma de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizada por extensiva destruição tecidual, foi também detectado o aumento da expressão dos genes de MMP-1, -2, -3, -7 e 9, e das concentrações de MMP-9 no fluido cérebro espinhal (Harris *et al.*, 2007).

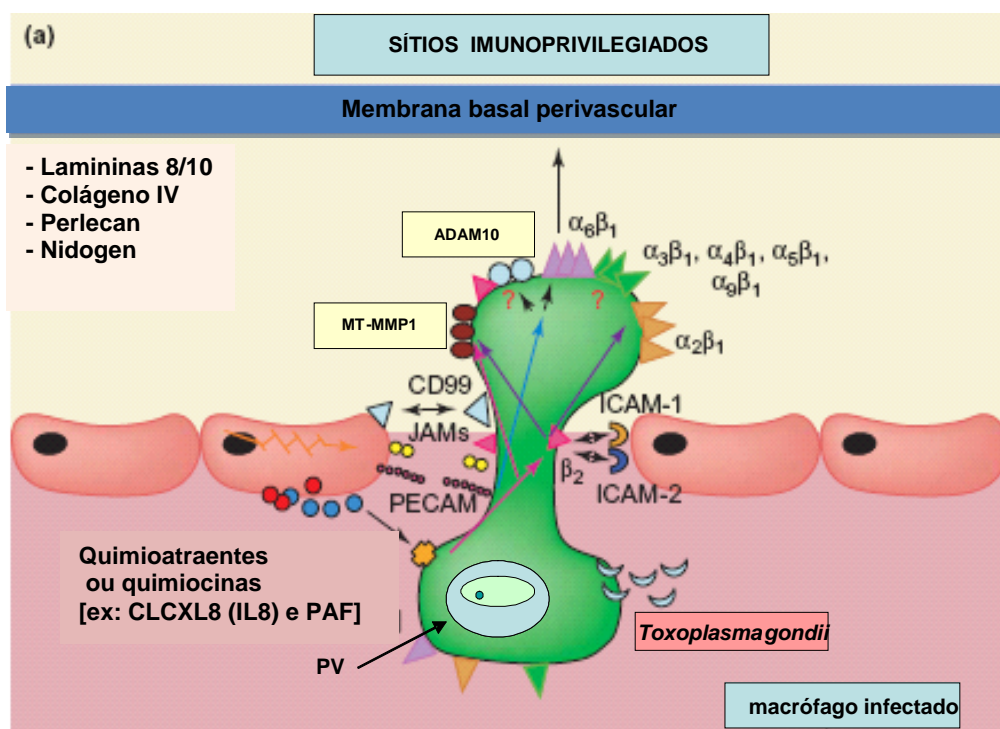


Figura 5- Entrada facilitada do *Toxoplasma gondii* em sítios imunoprivilegiados. O modelo proposto envolve a transmigração de macrófagos infectados através da barreira hematoencefálica ou hemato-retiniana, ocorrendo a regulação de integrinas e outras moléculas de adesão. Modificado de Nourshagh & Marelli-Berg, 2005.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Contribuir para a elucidação do papel de macrófagos na instalação do *T. gondii* em sítios imunoprivilegiados, avaliando a participação das metaloproteinases (de origem parasitária ou do hospedeiro) na regulação das moléculas de adesão e a utilização do complexo de migração da célula hospedeira envolvidos neste processo.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- Verificar a capacidade de adesão e de migração de macrófagos infectados com *T. gondii*;

3.2.2- Investigar o envolvimento de ERK 1/2 na adesão e transmigração de células infectadas pelo *T. gondii*;

3.2.3- Avaliar o envolvimento da via MAP quinases e de MMPs de matriz na capacidade de migração de células infectadas e na expressão de integrinas $\alpha\beta3$, através do uso de inibidores apropriados;

3.2.4- Avaliar o envolvimento de receptores reconhecedores de padrão molecular de patógenos na capacidade de migração de macrófagos Infectados com *T. gondii*;

3.2.5- Investigar a capacidade migratória de macrófagos infectados em matriz extracelular tridimensional;

3.2.6- Verificar a expressão de MT1-MMP, ADAM-10, CD44 e MMP9 em células infectadas com *T. gondii*;

3.2.7- Investigar a presença de MMPs em extrato protéico total do *T. gondii*.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Animais

Foram utilizados camundongos suíços (Swiss webster) para manutenção dos taquizoítos e camundongos C57/BL-6 de 3 linhagens (selvagem, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, cedidos gentilmente pelo Dr. S. Akira, Universidade de Osaka, Japão) para os demais experimentos, obtidos no biotério central da UENF e no biotério do LBR/CBB (onde são crescidos em isoladores), respectivamente. Os experimentos com animais de laboratório realizados neste trabalho tiveram a aprovação do comitê de ética para uso de animais (CEUA - 016/06).

4.2- Obtenção de *T. gondii* (cepa RH e RH-GFPS65T) para infecção *in vitro*

Os taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) e (cepa RH-GFPS65T, cedida gentilmente pelo Dr. Sibley da Washington University School of Medicine, Saint Louis) foram mantidos no infectório do LBCT (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual) sob supervisão do Dr. Renato DaMatta, em camundongos suíços de 3-4 semanas de idade provenientes do biotério da UENF, através de passagens sucessivas a cada dois dias, quando ocorre o pico de infecção. Os parasitos foram coletados injetando-se 3 ml de Tampão Fosfato Salino (PBS) estéril gelado sob o peritônio previamente exposto (por rebatimento de pele), o líquido peritoneal contendo os parasitos foi recolhido através de punção com seringa e agulha. Inoculou-se intraperitonealmente de 0,3-0,5ml por camundongo com agulha hipodérmica. Os parasitos foram centrifugados a 1000 g por 10min, ressuspensos em 1 ml de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM F-12) pH 7,2 (Gibco). Uma alíquota foi retirada e os parasitos foram corados com azul de Trypan para verificar viabilidade, contados em câmara de Neubauer e ajustados para as devidas proporções de infecção.

4.3- Linhagens celulares

Foram utilizadas células das linhagens de monócitos murinos (Raw 264.7) e humanos (THP1) para os ensaios de adesão/desadesão, transmigração *in vitro* e para ensaios de expressão de ERK e metaloproteinases, com um tempo de duplicação de cerca de 24h. As células Raw 264.7 e THP1 foram cultivadas em DMEM F-12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em garrafas de cultura de 75 cm³ (Corning), a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ em estufa.

4.4- Anticorpos utilizados

Para análise das moléculas de interesse através de citometria de fluxo e *Western blotting*, foram utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais [integrins α v (N-19) e β 3 (N-20); MMPs MT1-MMP (V-16), MMP9 (C-20), e ADAM-10 (S-20) - Santa Cruz Biotechnology]; ERK 1 (p44) e ERK 2 (p42) (eBioscience); CD44 (Pharmingen) específicos para a molécula de interesse e revelados com sistemas de amplificação com anticorpos biotinizados (Swine anti-Goat IgG Biotin conjugate – CALTAG) e streptoavidina conjugada a ficoeritrina (SIGMA).

4.5- Crescimento e adesão de células Raw 264.7 *In Vitro*

Células crescidas em garrafa de cultura foram coletadas, transferidas para tubos de 15 ml, dos quais foram retiradas alíquotas, coradas com azul de Trypan e contadas. Centrifugou-se a 1100 g por 10min a temperatura ambiente e ressuspendeu-se o sedimento em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, ajustando a proporção para 5x10⁶ células por ml. As células foram transferidas para placas de cultura de 96 poços em diluições seriadas, começando com 5x10⁵ células/poço em 200 μ l de meio. Estes experimentos foram realizados em sextuplicata, incubados na estufa a 37°C e 5% CO₂ por 18h. O sobrenadante foi descartado vertendo-se a placa, e acrescentou-se 50 μ l de fixador (glutaraldeído 0,2%)/poço por 10min. O fixador foi retirado, as células coradas com cristal violeta 0,05% por 10min e foi adicionado 200 μ l SDS 10% para a lise das células que permaneceram aderidas. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de placa utilizando-se filtro de 540 nm. Para conversão da densidade óptica lida no

espectrofotômetro em número de células aderidas a placa, foi feita uma curva padrão através de diluições seriadas com números de células pré-estabelecido. As células foram coradas com cristal violeta e a absorbância lida a 540 nm.

4.6- Obtenção de células de medula de camundongos e tratamento para diferenciação em macrófagos (BMDM)

Os camundongos utilizados para a obtenção de células de medula foram sacrificados em câmara de CO₂ e lavados com álcool 70%. Todo o procedimento foi feito no fluxo laminar com material (tesouras e pinças) estéril, mantido em recipiente contendo álcool 70%. O camundongo foi fixado em placa de isopor, previamente encapada com papel alumínio. O acesso ao fêmur foi feito expondo-se o peritônio e em seguida removendo os músculos do fêmur com tesoura e pinças. Após a limpeza, as duas extremidades do fêmur foram cortadas para acesso a medula, e este foi colocado em placa de Petri contendo meio D-MEM F-12 com 10% de SFB e 0,5% de gentamicina. A retirada da medula foi feita injetando-se parte deste meio de cultura no interior do osso, utilizando-se seringas hipodérmicas. As células foram soltas com pipetas de vidro e no final transferidas para garrafas de 5 ml e deixadas na estufa a 37°C por 18h.

Após o período de incubação, o sobrenadante das garrafas de cultura foi transferido para tubo de 15 ml estéril e centrifugado a 1200 g por 10min. O sedimento foi ressuspenso em meio D-MEM F-12 com 10% de SFB e 20% de sobrenadante de células L929 para diferenciação da linhagem monocítica em macrófagos. As células foram transferidas para garrafas de cultura e mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

4.7- Tratamento das células *in vitro*

4.7.1- Tratamento com LPS

O estoque de LPS concentrado a 1mg/ml foi reajustado para uma concentração final de 10 ng/ml no meio de cultura contendo as células, que foram incubadas por 30min ou 1h. Após o período correspondente, as células foram coletadas para análise como descrito abaixo.

4.7.2- Infecção com *T. gondii*

As células foram infectadas com *T. gondii* (cepa RH), recém coletados do peritônio de camundongos previamente infectados, numa proporção de 10 ou 5 taquizoítos para cada célula (10:1 ou 5:1), durante o período de 30min e 1h para análise das moléculas da via de transdução de sinal ou por 24h para análise da expressão de integrinas ou MMPs através de *Western blotting*.

4.7.3- Tratamento com LPS e infecção com *T. gondii*

As células foram pré-incubadas com LPS (10 ng/ml) por 30min, após este período, foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o meio contendo o *T. gondii* foi adicionado na proporção de 5:1 (parasitos:célula) pelos períodos já indicados.

4.7.4- Tratamento com inibidores de MMPs e de MEKK

O tratamento com os inibidores ocorreu através de dois procedimentos distintos. No primeiro, o inibidor de MMPs de amplo espectro (MMP-inibitor I – 15 μ M) ou o inibidor de fosforilação de ERK (u0126- 1 μ M) foram adicionados a cultura, logo após os tratamento com LPS ou a infecção com *T. gondii* e permaneceram pelos tempos indicados de 24h e 48h. No segundo, os inibidores foram pré-incubados com os parasitos ou com as células separadamente por 1h, as amostras foram centrifugadas para remoção dos inibidores, o sobrenadante foi descartado, antes da adição dos parasitos a cultura de células.

4.7.5- Preparo das células para *Western blotting*

Depois dos devidos tratamentos as células foram centrifugadas a 1200 g por 10min a 4°C e o meio removido. As células foram ressuspensas em 500 μ l de tampão de lise Low Ripa (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,5% Triton X-100) e expostas a condição de choque térmico (congelamento a -20 °C seguido de descongelamento a temperatura ambiente) por 3 vezes. O material foi centrifugado (10.000g por 10min a temperatura ambiente) e o sobrenadante

recolhido. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Ao sobrenadante com tampão de lise foi adicionado acetona (2 v/v) e deixado durante 12h precipitando a -20°C . Depois da precipitação, as amostras foram mais uma vez centrifugadas e o sobrenadante removido. O sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra 1x (15 mM Tris pH 6,8; 0,5% SDS; 1,25% β -2 mercaptoetanol; 2,5% glicerol; 0,025 azul de bromofenol), fervido por 5min e centrifugado a 200 g por 1min. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12%, mantendo-se uma concentração de 100 μg de proteínas em 30 μl de tampão por canaleta. Os resultados foram analisados por *Western blotting*, cuja transferência foi feita a 10 V, com amperagem aberta por um período de aproximadamente 1h e 30min em tampão fosfato, e revelado com DAB (Diaminobenzidina).

4.8- Análise da capacidade de adesão e transmigração de macrófagos *in vitro*

O experimento de adesão sobre poliestireno e a transmigração através de componentes da matriz extracelular, foi realizado com BMDM e com células Raw 264.7. A infecção com *T. gondii* foi feita em tubos não aderentes de 15 ml na proporção de 5:1 (parasitos:célula), por um período de 1h a temperatura ambiente, em seguida as células foram centrifugadas a 1200 g por 10min e ressuspenso em DMEM F-12 com 2% de SFB. As células são distribuídas em placas de 24 poços. Os poços sem inserto receberam 5×10^5 células em 500 μl de meio enquanto que os poços com inserto (ThinCertTM- Pore \varnothing 8.0 μm / Greiner bio-one) receberam 5×10^4 células em 300 μl de meio diretamente no inserto e mais 300 μl de meio no poço. Os tempos de incubação foram de 24h e 48h, após estes períodos os sobrenadantes foram recolhidos dos poços e dos insertos, as células foram coradas com o corante vital azul de Trypan, para avaliar a viabilidade, e contadas na câmara de Neubauer.

As células que não transmigraram foram retiradas do interior do inserto por lavagem com PBS e auxílio de *swab*, suavemente para não soltar as que estavam aderidas na face inferior da membrana. Adicionou-se 400 μl de fixador (p-formaldeído 1% em PBS) por inserto. Após a secagem dos insertos a temperatura ambiente, as membranas foram recortadas dos insertos com lâmina de bisturi, montadas sobre lâminas contendo glicerol com a face inferior voltada para cima e cobertas com lamínulas. As células transmigradas, que se encontravam na face inferior da membrana foram contadas em 10 campos na objetiva de 20x, em sistema

AxioVision (Zeiss), a partir das quais fez-se a média para montagem dos gráficos. Os resultados dos ensaios de migração foram expressos como a porcentagem de invasão através do Matrigel™ e membrana, relativos a migração através da membrana controle sem Matrigel™. O índice de invasão foi expresso como a razão entre a porcentagem de invasão de macrófagos infectados *versus* a porcentagem de invasão de macrófagos não infectados.

4.9- Citometria de fluxo para avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz de membrana e moléculas de adesão após a infecção com *Toxoplasma gondii*

Todas as células utilizadas para experimentos *in vitro*, infectadas ou não, foram lavadas uma vez com solução de lavagem/bloqueio (PBS-albumina 1%) a 4°C. Para análise da expressão dos marcadores foram utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para a molécula de interesse e revelados com sistema de amplificação com anticorpos biotinilados (Swine anti-Goat IgG Biotin conjugate – CALTAG) e streptoavidina conjugada a ficoeritrina (SIGMA). Imunoglobulinas (IgGs) não relacionadas de mesmo isotipo ou a streptoavidina fluorescente foram utilizados como controle de ligações inespecíficas. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes em PBS/albumina 1%, fixadas com p-formaldeído 1% e assim analisadas. Alternativamente, as células foram lavadas após o período de incubação, fixadas e então incubadas com os anticorpos para as moléculas de interesse. A leitura das amostras e a análise dos resultados foi realizada em citômetro de fluxo BD FACScalibur, na UENF. A leitura de emissão da fluorescência verde (FITC) foi realizada em um sistema de filtros DL500 e BP525 nm e a leitura de emissão de fluorescência laranja (PE) em filtros 600DL e BP575 nm, com consequente amplificação de sinal através de fotomultiplicadores individuais, após excitação dos fluorocromos com laser de 488 nm.

4.10- Extração de proteases do *Toxoplasma gondii*

Os taquizoítos de *T. gondii* foram recolhidos do peritônio de camundongos como descrito anteriormente, centrifugados a 1200 *g* por 10min. Os eppendorfs contendo o sedimento foram congelados por imersão em nitrogênio líquido e

descongelados em estufa a 37° C por 3 vezes. Adicionou-se 750 µl de tampão de incubação de proteases (200 mM, 50 mM Tris-HCl, 4 mM CaCl₂ pH 7,1) e as amostras foram sonicadas em 20 ciclos de 30seg em potência de 6 Watts (RMS) com intervalo de 2min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 25min, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20° C até a utilização.

4.11- Imunoprecipitação de MMP-9 do sobrenadante de cultura de células Raw 264.7 e análise de atividade por zimografia

Células Raw 264.7 previamente crescidas em garrafas de cultura, foram coletadas e ajustadas para 3x10⁷ células/ml e infectadas ou não em tubos de polipropileno, em meio DMEM F-12 com 2% SFB, na proporção de 5:1 parasitos/célula. Foram utilizadas células Raw 264.7 não infectadas como controle; tratadas com LPS por 30min; infectadas com *T. gondii*, ou previamente tratadas com LPS por 30min e infectadas com *T. gondii*. O sobrenadante da cultura foi recolhido, centrifugado a 1200 g por 10min para retirada das células, concentrado em sistema Sartori™, com poro de exclusão > 10.000 Da, e utilizado para o procedimento de imunoprecipitação.

A proteína G-agarose foi lavada (15 µl/amostra) adicionando-se tampão de ligação/lavagem (0,1 M fosfato de sódio pH7,0; 0,15 M cloreto de sódio; 0,5 M EDTA; 0,01% azida sódica) centrifugando-se em seguida a 1200 g por 10min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 15 µl (3 µg) do anticorpo anti-MMP-9 e incubou-se a temperatura ambiente, sob agitação por 2h. Após a ligação da proteína G ao anticorpo, as amostras foram adicionadas, incubadas por 30min a temperatura ambiente e por mais 18h a 4°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 g por 10min, e o sedimento ressuspendido em 30 µl de tampão de amostra 1x (sem β-mercaptoetanol). As amostras foram analisadas através de zimografia em gel de poliacrilamida 8% adicionado de 0,1% de gelatina, submetido a eletroforese por aproximadamente 2h a 100 V. Após a corrida, o gel foi lavado 3x sob agitação com tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl e 2,5 % Triton X 100) e em seguida foi incubado por 48h a 37° C, em tampão contendo (50 mM Tris-HCl, 1 % Triton X 100, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ e 0,01 % NaN₃). Em seguida, o gel foi corado com azul de Comassie, descorado em água destilada e fotografado.

4.12- MALDI TOF/TOF

Os experimentos relatados a seguir foram realizados em colaboração com o Dr. Claudio Retamal (LBCT/UENF) pela mestranda Roberta Fernandes Pinto e as análises MALDI TOF/TOF foram realizadas pelo Dr. André Teixeira na FioCruz.

O extrato total de *T. gondii* foi submetido a zimografia com 0,1% de gelatina em 10% de poliacrilamida por aproximadamente 2h a 100 V. Após separação, as bandas de atividade gelatinólica de interesse, foram extraídas do gel de poliacrilamida, digeridos com tripsina e aplicadas em sistema MALDI TOF/TOF de análise, para identificação das proteínas de interesse por homologia de massa.

4.13- Análise estatística

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho foram submetidos a análise estatística, através de método não paramétrico de Kruskal–Wallis ou Mann-Whitney utilizando-se do programa [GraphPad InStat](#).

5- RESULTADOS

5.1- Adesão e transmigração de macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii in vitro*

O ensaio abaixo, teve como objetivo verificar a influência do *T. gondii* na capacidade de adesão de células da linhagem Raw 264.7. As células foram plaqueadas, infectadas com *T. gondii* (10:1 – parasitas:célula) e lavadas. Como observado, estas células quando infectadas desaderem significativamente nas primeiras 24h porém, esta desadesão é transitória e as células voltam a aderir 48h após a infecção, sem no entanto, retornar aos níveis das células não infectadas (Figura 6).

Para avaliar a viabilidade das células que desaderiram, o sobrenadante dos poços foi coletado, corado com azul de Trypan e as células viáveis desaderidas foram contadas. Observamos que apesar de não estarem aderidas a placa, as células permaneceram viáveis, mesmo após a infecção (Figura 7). A capacidade de migração dos macrófagos foi avaliada por ensaio de transmigração em placas de cultura contendo insertos com membrana de poros de 8 µm. As células foram infectadas e adicionadas aos insertos na placa de cultura. Após os tempos indicados a placa foi lavada, as células que migraram foram fixadas e coradas. Na figura 8, podemos observar que não houve diferença significativa na transmigração nas primeiras 24h de infecção, porém 48h após a infecção, as células Raw 264.7 infectadas foram capazes de transmigrar em maior número do que as células controle, não infectadas.

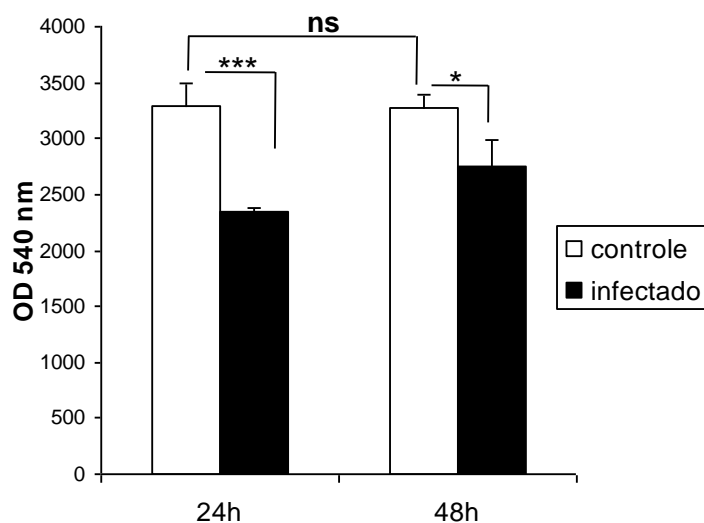


Figura 6- Adesão de macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*. Células Raw 264.7 foram infectadas na proporção de 10:1 (parasitos:célula). Após os tempos indicados, as células foram lavadas, fixadas, coradas e lisadas como descrito na metodologia. O lisado foi transferido para placas de 96 poços e a absorbância lida a 540 nm. Resultados expressos como média DP (n=6; p< 0,001***; p< 0,05*).

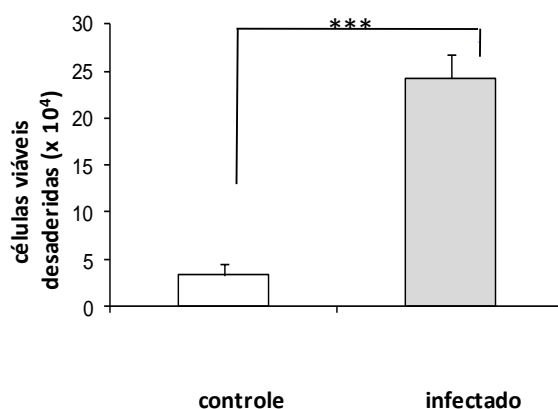


Figura 7- Viabilidade de células Raw 264.7 desaderidas após a infecção com *Toxoplasma gondii*. O sobrenadante das culturas controle ou infectadas, foi analisado para a presença de células viáveis, após 24 horas, através da contagem com azul de Trypan. O número inicial de células por experimento foi de 5×10^5 células por poço. Resultados expressos como média DP (n=6; p< 0,001***).

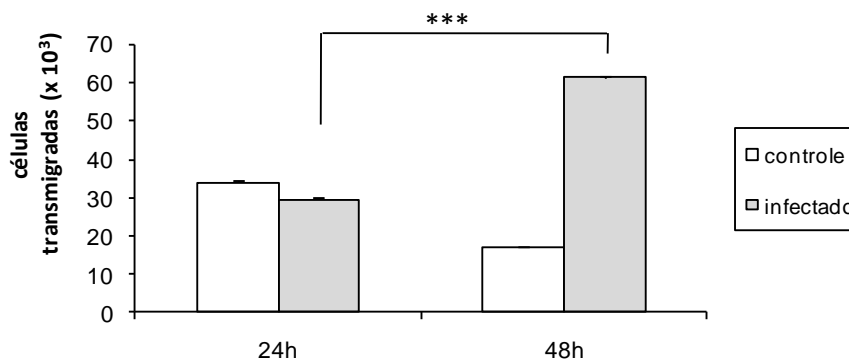


Figura 8- Transmigração de células Raw 264.7 após a infecção com *Toxoplasma gondii*. Foram colocadas 5×10^5 células por inserto (poros de $8 \mu\text{m}$) após 1h de infecção prévia, na proporção de 5:1 (parasitos: célula). Após os tempos indicados, o inserto foi removido, a placa foi lavada, as células aderidas no fundo da placa foram fixadas, coradas com Cristal violeta 0,05 % e lidas a 540 nm. Os dados de densidade ótica foram convertidos em número de células, seguindo-se uma curva padrão previamente estabelecida. Resultados expressos como média DP (n=3; $p < 0,001^{***}$).

5.2- Expressão de ERK1/2 quinases em macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*

Observamos que células Raw 264.7 ativadas por LPS, um componente bacteriano que induz ativação da via *Toll*, ou previamente ativadas com LPS e infectadas com *T. gondii* apresentaram aumento na expressão de ERK1/2 em relação ao controle em 30min, porém, o aumento foi mais significativo quando as células foram infectadas com *T. gondii*, sem prévia ativação com LPS (Figura 9). Após 60min o aumento na expressão de ERK1/2 foi similar para todos os tratamentos observados em relação ao controle (Figura 9).

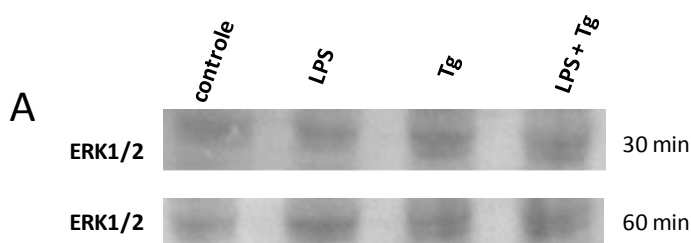


Figura 9 - Expressão de ERK1/2 em macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*. Células Raw 264.7 foram tratadas com LPS; infectadas com *T. gondii* (10:1 – parasitos:célula) ou previamente tratadas com LPS e então infectadas com *T. gondii*. Células não tratadas foram utilizadas com controle. As amostras foram submetidas a separação em SDS page 12 % e analisadas por Western Blotting em 30min ou 60min após os tratamentos indicados.

5.3- Adesão de macrófagos tratados com inibidores para as vias MAP quinases, antes ou após a infecção

Para verificar se a via de sinalização da ERK1/2 está envolvida na desadesão de macrófagos infectados com *T. gondii*, células Raw 264.7 foram tratadas com inibidor de MEKK (u0126). As células desadesidas presentes no sobrenadante da cultura foram coradas com azul de Trypan e contadas. Verificamos que na presença do inibidor de MEKK as células tiveram sua capacidade de adesão reduzida significativamente, sendo encontrado maior número de células infectadas desadesidas 24h após a infecção, o mesmo não foi observado após 48h de infecção. A capacidade de adesão das células controle não foi afetada na presença do inibidor (Figura 10 A). Para verificarmos se o inibidor estava influenciando nos mecanismos de sinalização das células, dos parasitos ou de ambos, incubamos separadamente as células e o *T. gondii* com o inibidor u0126 antes da infecção. Observamos que quando as células foram pré incubadas com o inibidor antes da adição do *T. gondii*, a sua capacidade de adesão foi reduzida significativamente apenas em 48h após a infecção (Figura 10 B). Por outro lado, quando o *T. gondii* foi pré-incubado com o inibidor de MEKK antes de ser adicionado a cultura, as células tiveram sua capacidade de adesão aumentada já em 24h após a infecção (Figura 10 B). Em seguida avaliamos se este inibidor estava alterando a adesão das células por interferir na capacidade de infecção do *T. gondii*. Para isto células foram infectadas com *T. gondii* e o inibidor adicionado a cultura imediatamente após a infecção ou pré incubado com as células e o *T. gondii* separadamente antes da infecção. Observamos que o inibidor de MEKK diminuiu a porcentagem de infecção em todos os tratamentos, porém, quando foi adicionado as células antes da adição do *T. gondii* a cultura, reduziu significativamente a capacidade de infecção do *T. gondii* (Figura 11).

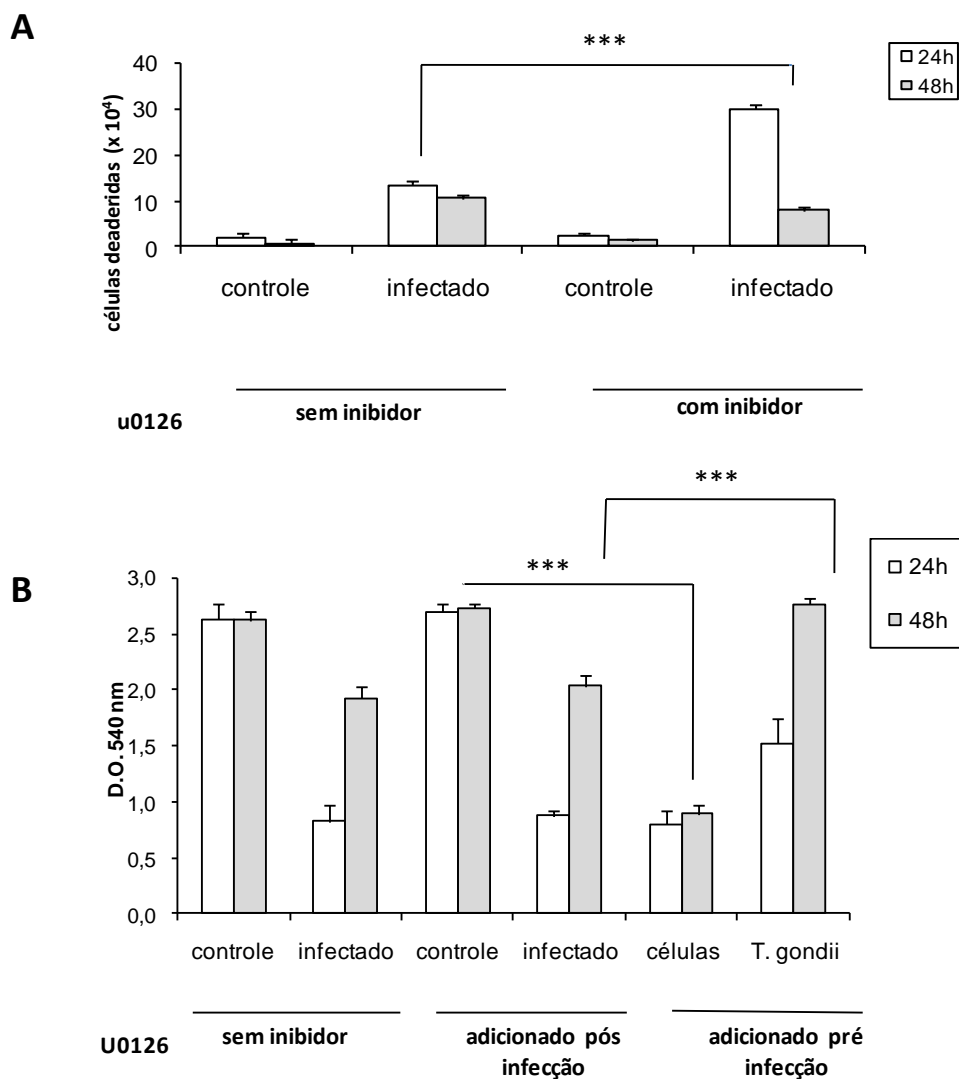


Figura 10- Adesão de células Raw 264.7 infectadas com *Toxoplasma gondii* e tratadas com inibidor de MEKK (u0126) antes ou após a infecção. O sobrenadante das culturas controle ou infectadas **(A)**, foi analisado para a presença de células viáveis, após 24 h e 48 h, através da contagem com azul de Trypan, **(B)** Adesão de células infectadas, tratadas ou não com o inibidor u0126. Resultados expressos como média DP (n=3; p< 0,001***).

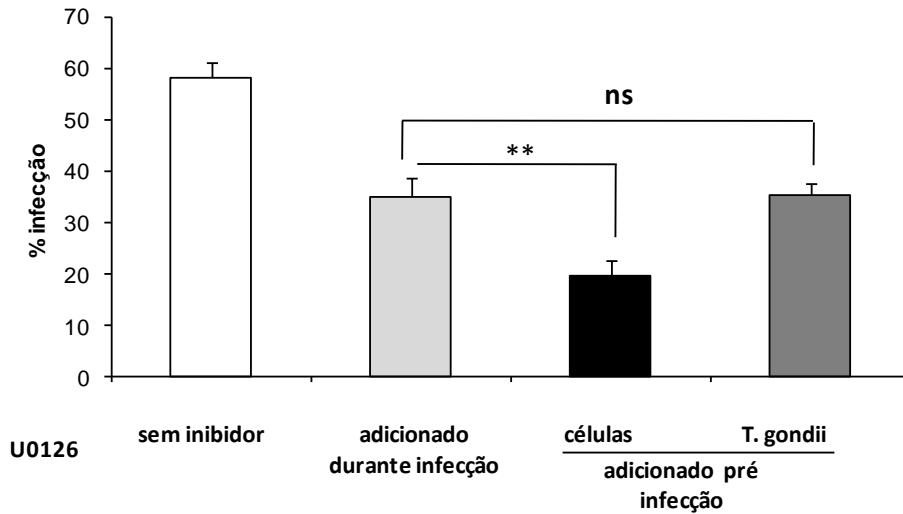


Figura 11- Porcentagem de macrófagos murinos infectados por *Toxoplasma gondii*. Células Raw 264.7 foram tratadas com inibidor de MEKK (u0126) 0,1 mM antes ou após a infecção. As células foram fixadas, coradas com Giemsa e analisadas por microscopia óptica convencional para a porcentagem de células infectadas. Resultados expressos como média DP (n=3; p< 0,01**).

5.4- Envolvimento de TLRs na capacidade de migração de macrófagos infectados pelo *Toxoplasma gondii*.

Com o objetivo de avaliar o envolvimento de TLRs na capacidade de adesão e migração de macrófagos, foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos nocaute para o gene TLR2 (receptor 2 do tipo *tol*) ou para o gene CD14 (co-receptor para o receptor 4 do tipo *tol*) em ensaios de transmigração após a infecção com *T. gondii*. Como controle foram utilizadas células de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem. As células infectadas ou não, aderidas a placa, foram coradas e lisadas. Observamos que as células dos camundongos nocaute apresentaram uma desadesão significativa após 24h de infecção (Figura 12 A), que foi mantida até 48 h após a infecção, quando comparada com as células controle (Figura 12 B).

Para avaliarmos o envolvimento de TLRs na migração de macrófagos, BMDM foram adicionados em placas de cultura contendo insertos com membrana de poros de 8 μ m. As células foram infectadas e adicionadas aos insertos na placa de cultura. Após os tempos indicados a placa foi lavada, as células fixadas e coradas. Verificamos que na ausência do receptor TLR2 as células migraram com maior velocidade em ambos os períodos avaliados, quando comparadas as células controle dos camundongos selvagens na ausência de infecção. O mesmo não foi observado para as células dos camundongos deficientes em CD14/TLR4 (Figura 13 A). Para avaliarmos a migração induzida pelo *T. gondii* nestes sistemas, calculamos o delta de migração, que é a diferença entre os valores de DO da célula infectada pelo da célula controle para todos os sistemas. Verificamos que houve uma redução significativa na migração das células deficientes em TLR2 apenas em 48h (Figura 13 B).

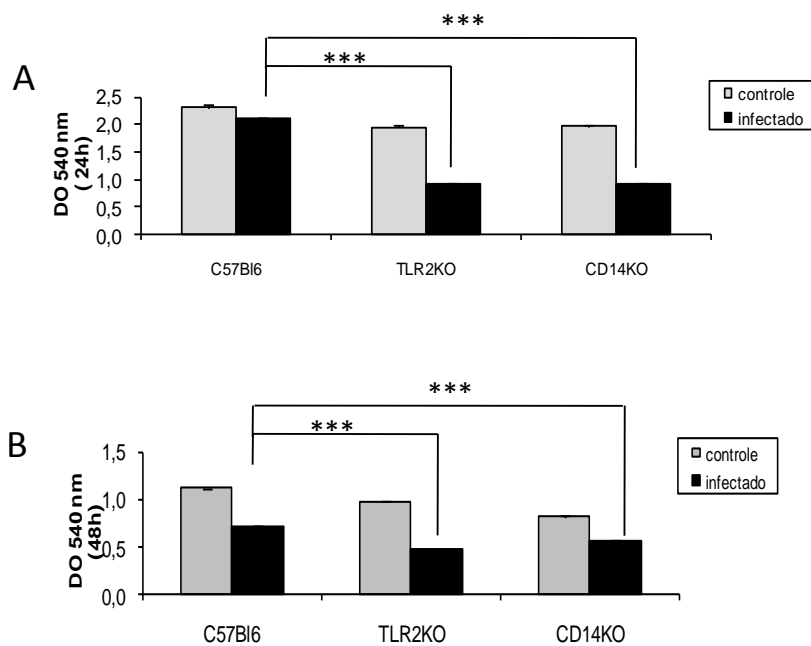


Figura 12- Ensaio de adesão de BMDM deficientes em TLR2 ou CD14. Macrófagos de medula óssea foram gerados como descrito acima, e infectados na proporção de 5:1 (parasitos:célula). Após 24h (**A**) e 48h (**B**), foi avaliado o número de células aderidas como descrito anteriormente. Resultados expressos como média DP da leitura da absorbância a 540 nm. Resultados expressos como média DP (n=6; p< 0,001***).

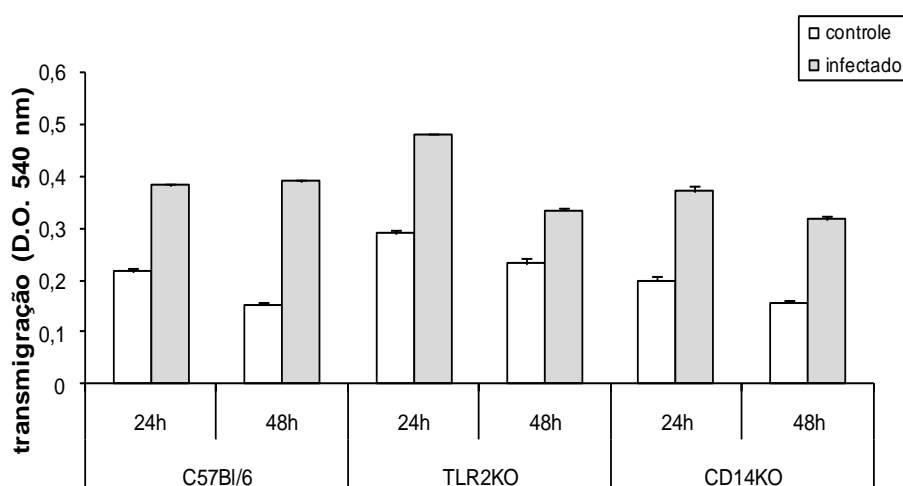
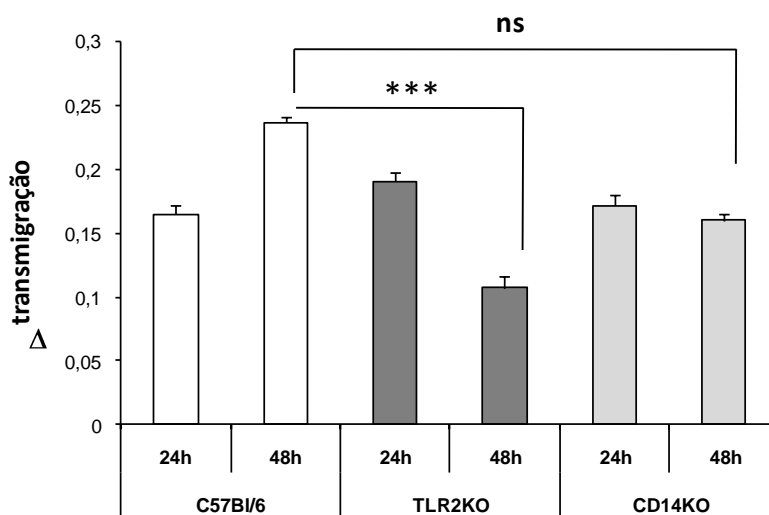
A**B**

Figura 13- Ensaio de transmigração de BMDM de camundongos deficientes em TLR2 ou CD14. Macrófagos de medula óssea foram gerados como descrito acima, e infectados com *Toxoplasma gondii* na proporção de 5:1 (parasitos:célula) por 1 h antes de serem colocados em placas de 24 poços contendo insertos (poros de 8 mm). Em **(A)** resultados expressos como média DP da leitura da absorbância a 540 nm; em **(B)** Δ de transmigração (induzida pelo *T. gondii*). (n=3; p< 0,001***; ns = não significativo).

5.5- Adesão de macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii* tratados com inibidores de MMPs

Avaliamos a influência das MMPs das células e do *T. gondii* na capacidade de adesão das células, para tanto, foi adicionado um inibidor de metaloproteinases (MMP inhibitor I) a cultura durante a infecção. Observamos que o inibidor de MMPs diminuiu a capacidade de adesão das células 24h após a infecção (Figura 14 A). Em seguida avaliamos se este inibidor estava alterando a adesão das células por alterar a capacidade de infecção do *T. gondii*. Para isto células foram infectadas com *T. gondii* e o inibidor adicionado a cultura imediatamente após a infecção ou pré incubado com as células ou com o *T. gondii* separadamente antes da infecção. Observamos que o inibidor de MMPs diminuiu a porcentagem de infecção em todos os tratamentos, porém, quando foi adicionado ao *T. gondii* antes da sua adição a cultura, reduziu significativamente a capacidade de infecção do *T. gondii* (Figura 14 B).

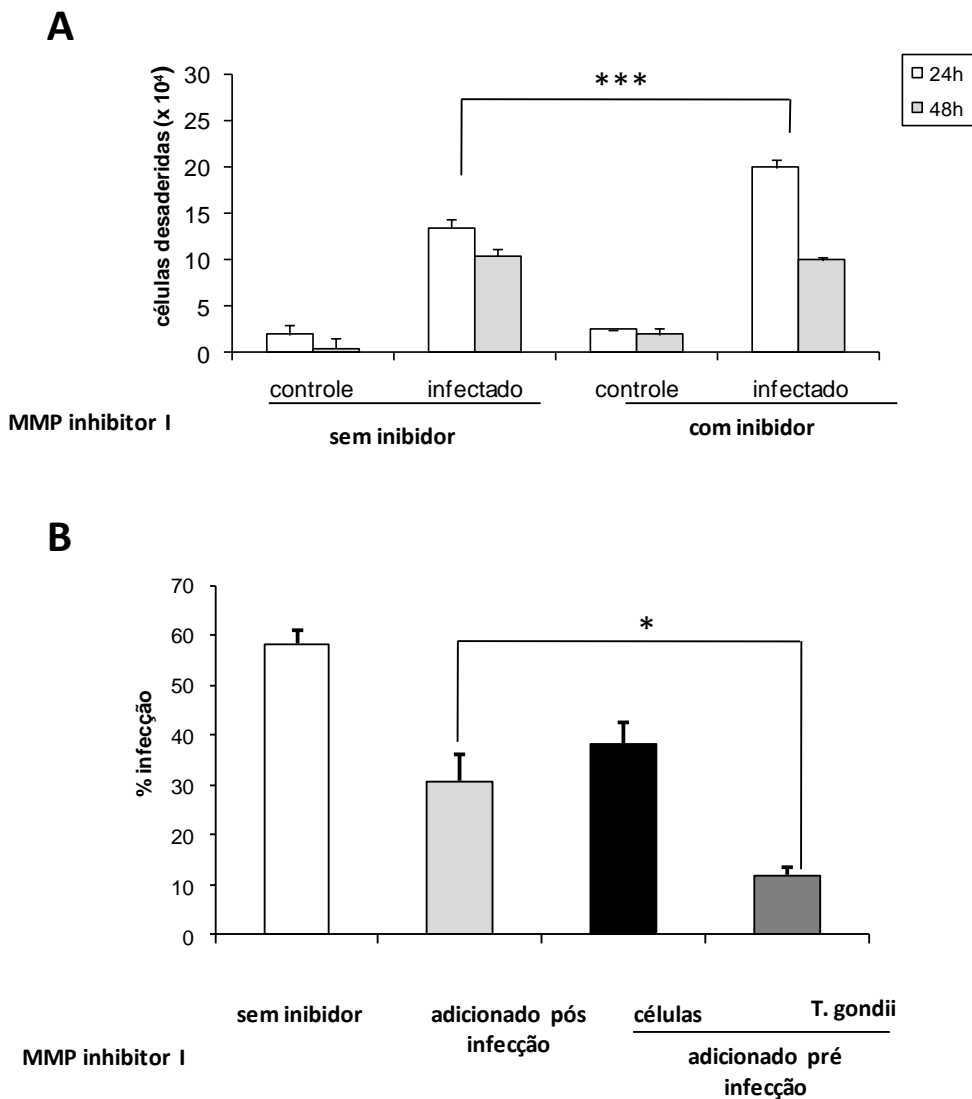


Figura 14- Adesão de células Raw 264.7 infectadas com *Toxoplasma gondii* e tratadas com inibidor de metaloproteinases (MMP inhibitor 1). **(A)** A presença de células viáveis e sua adesão foi analisada no sobrenadante das culturas após 24 h e 48 h de infecção, na presença ou não do inibidor de MMPs, através da contagem com azul de Trypan. **(B)** Porcentagem de macrófagos murinos infectados por *T. gondii*. Células Raw 264.7 foram tratadas com inibidor de MMPs antes ou após a infecção. As células foram fixadas, coradas com Giemsa e analisadas por microscopia óptica convencional para a porcentagem de células infectadas. Resultados expressos como média DP (n=3; p< 0,001***; 0,05 *).

5.6- Transmigração de macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii* em sistema contendo matrigel na presença de inibidor de metaloproteinases

A influência de MMPs expressas ou secretadas na capacidade de migração e invasividade de macrófagos murinos infectados com *T. gondii*, foi avaliada em sistema de transmigração, contendo insertos recobertos com matriz 3D (Matrigel™) que mimetiza a ECM, na presença de inibidor de MMPs (MMP inhibitor I), um inibidor de amplo espectro, um ácido tetrapeptidil hidroxâmico que inibe as MMPs das famílias das gelatinases, estromelisinases e colagenases.

Para estes experimentos, células Raw 264.7 infectadas com *T. gondii* fluorescente (cepa RH-GFPS65T) foram submetidas a gradiente de Percoll para separação dos parasitas que não foram internalizados. As frações foram analisadas separadamente por microscopia óptica de epifluorescência (Figura 15 A e 15 B) e por citometria de fluxo (Figura 15 C) para avaliarmos a fração ideal a ser adicionada ao sistema de transmigração. Observamos que a fração de 40 % a 50 % correspondia, em sua maioria, as células com parasitos internalizados (Figura 15 A, B e C). Esta fração foi utilizada em todos os experimentos subsequentes de transmigração em matrigel, porém com parasitas não fluorescentes. Células Raw 264.7 previamente infectadas com *T. gondii* foram adicionadas ao sistema de transmigração com insertos contendo ou não Matrigel, como recomendado pelo fabricante para o cálculo de invasividade, na presença ou não de inibidor de MMPs. Verificamos que no processo de transmigração em Matrigel na presença do inibidor, houve uma pequena redução na taxa de transmigração 24h após a infecção, porém esta redução chegou quase a 100 % 48h após a infecção, quando comparadas ao controle sem inibidor (Figura 16 A), o que foi confirmado quando calculamos a porcentagem de invasão, que também foi praticamente abolida na presença do inibidor após 48h de infecção (Figura 16 B). O índice de invasividade representado pela razão entre a porcentagem de invasão de macrófagos infectados tratados com inibidor e macrófagos infectados não tratados, demonstrou que a presença do inibidor de MMPs na cultura reduziu significativamente a capacidade invasiva destas células (Figura 16 C). Na figura 17 observamos que as células que estavam transmigando em 48h estão densamente infectadas.

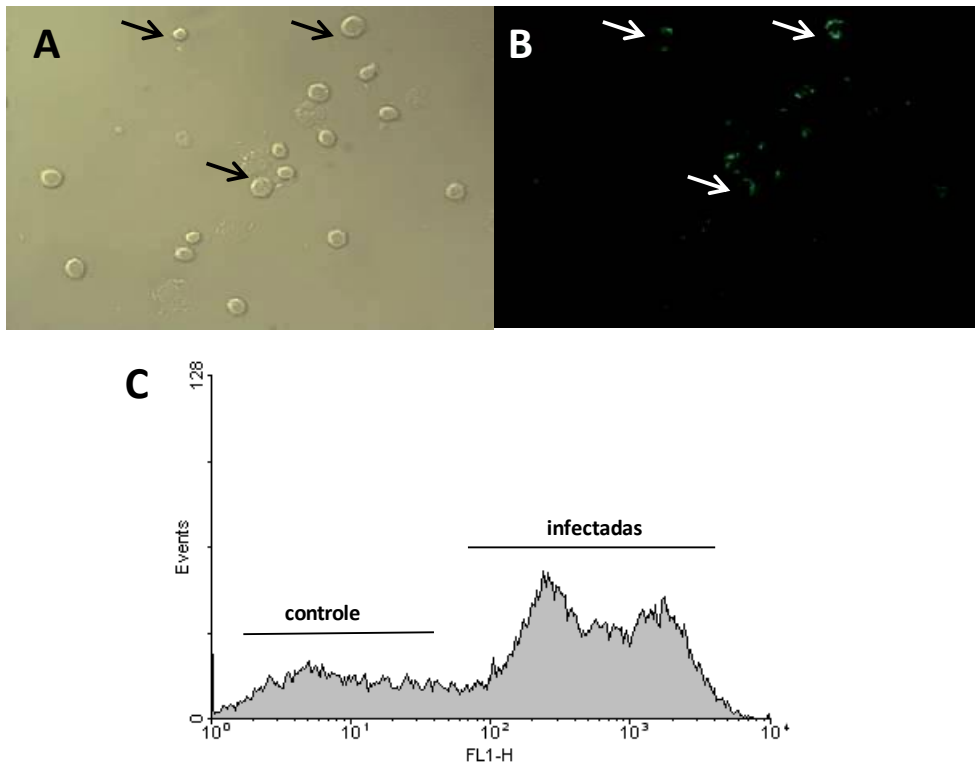


Figura 15- Células Raw 264.7 infectadas com *Toxoplasma gondii* fluorescente, foram submetidas a gradiente de Percoll para separação dos parasitos que não foram internalizados. As frações foram analisadas separadamente por: **(A)** microscopia óptica de campo claro; (aumento 40x) **(B)** microscopia óptica de fluorescência (aumento 40x); **(C)** citometria de fluxo.

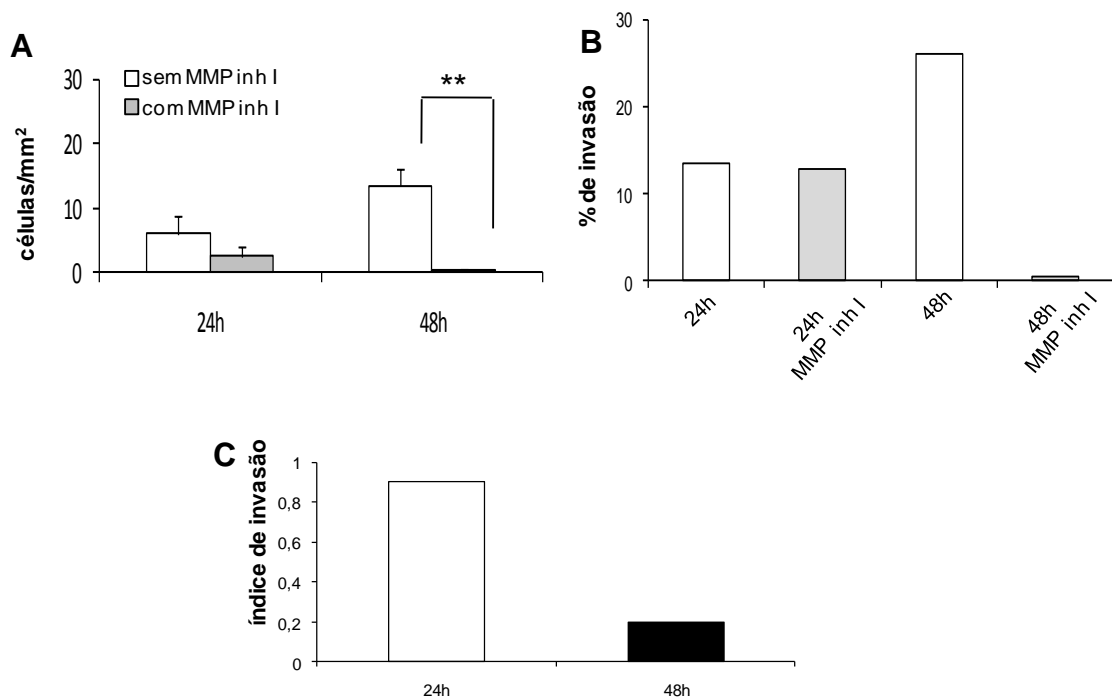


Figura 16- Transmigração de macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com inibidor de MMP, através de Matrigel. Células Raw 264.7 foram tratados com inibidor de MMPs antes ou após a infecção. A membrana foi retirada, fixada e corada. **(A)** Total de células transmigradas por mm²; **(B)** Porcentagem de invasão em matrigel em 24h ou 48h após a infecção, na presença ou ausência do inibidor de MMP I; **(C)** o índice de invasão foi calculado como recomendado pelo fabricante. Resultados são representativos de dois experimentos realizados; e expressos como média DP (p < 0,01**).

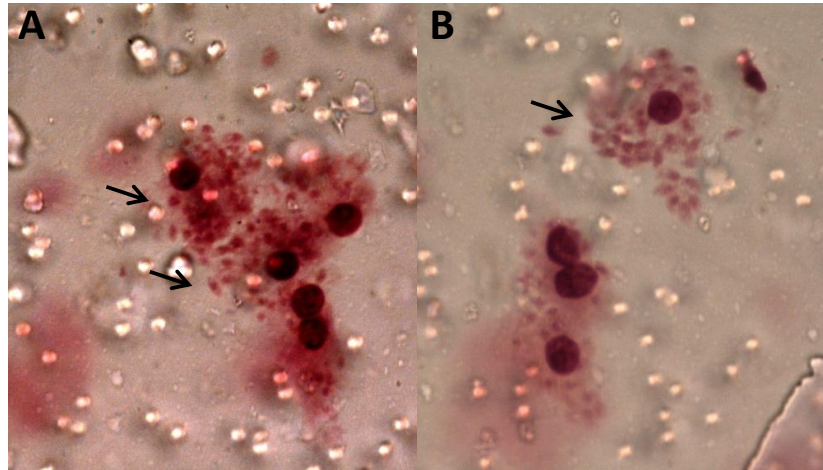


Figura 17- Transmigração de macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii*. Imagem obtida através de microscopia óptica em aumento de 40x. As setas indicam células Raw 264.7 infectadas com *T. gondii*, aderidas na face inferior da membrana do inserto.

5.7- Expressão das metaloproteinases de matriz extracelular ADAM10 e MT1-MMP em macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*

Células Raw 264.7 foram infectadas com *T. gondii* com ou sem pré ativação com LPS. As células foram marcadas com anticorpos anti-MT1-MMP ou anti-ADAM10 e analisadas por citometria de fluxo e *Western blotting*. Verificamos que a expressão da metaloproteinase de membrana MT1-MMP foi aumentada nas células infectadas e nas células que foram pré tratadas com LPS antes da infecção com *T. gondii* (Figura 18 A). Quando analisamos o extrato total destas células por *Western blotting*, observamos que nas células pré tratadas com LPS antes da infecção houve maior expressão da forma molecular de 66 KDa, correspondente a forma ativa da molécula (Figura 18 B). O mesmo perfil de expressão foi observado para a metaloproteinase ADAM10 que também foi aumentada nas células infectadas e nas pré ativadas com LPS de maneira similar (Figura 19 A). Através de *Western blotting* foi possível constatar que a ADAM10 além de ter sua expressão aumentada, encontrava-se ativa, porém, apenas nas células que foram previamente tratadas com LPS antes da infecção com *T. gondii*, nas quais houve clivagem e liberação do seu pró-domínio inibidor de 21,5 KDa (Figura 19 B).

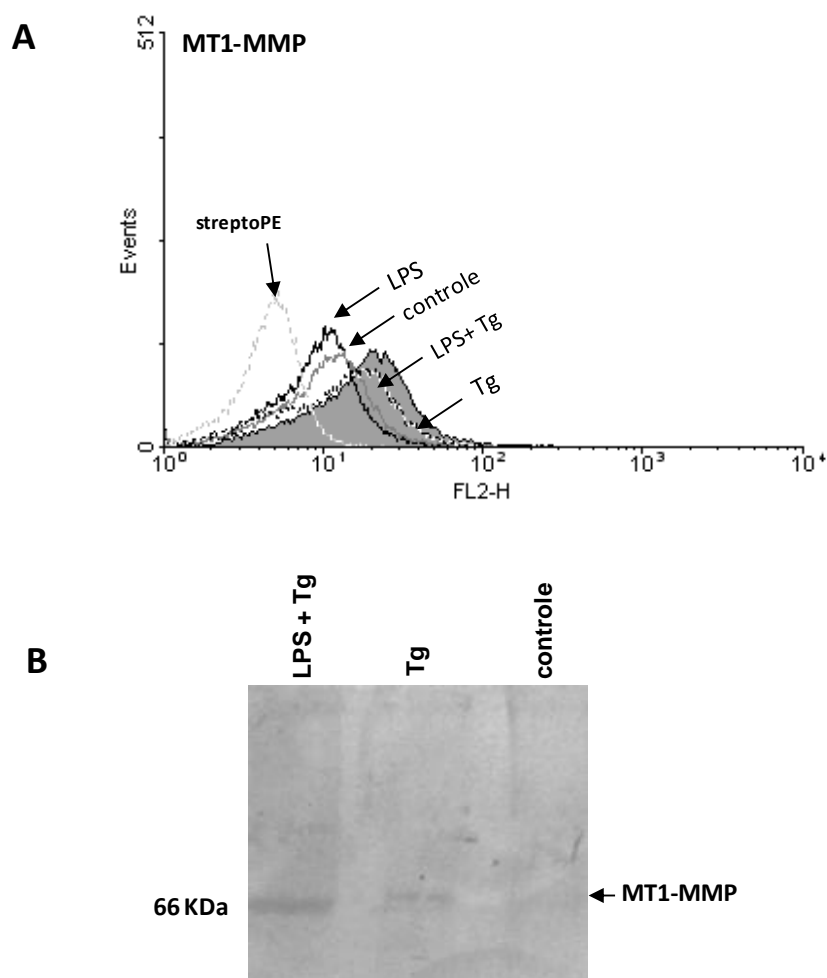


Figura 18 - Expressão da metaloproteinase transmembrana MT1-MMP. Células Raw 264.7 foram infectadas com *Toxoplasma gondii*, com e sem pré ativação com LPS. As células foram marcadas com anticorpos anti MT1-MMP1 para citometria de fluxo **(A)** 20.000 eventos contados. **(B)** Extrato total das células infectadas foram separados por SDS- PAGE, após correção do conteúdo protéico para 100 μ g por linha, e analisados por Western Blotting para a presença de MT1-MMP e seus fragmentos.

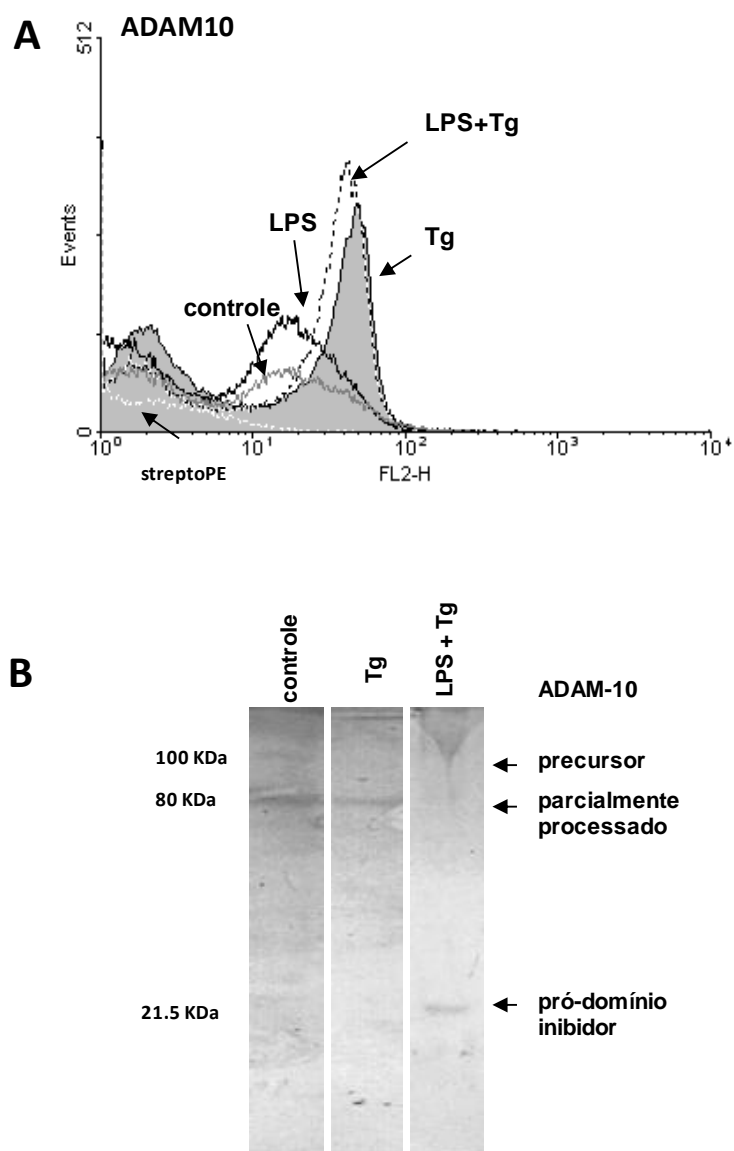


Figura 19- Expressão da metaloproteína transmembrana ADAM10. Células Raw 264.7 foram infectadas com *Toxoplasma gondii*, com e sem pré ativação com LPS. As células foram marcadas com anticorpos anti ADAM10 para citometria de fluxo **(A)** 20.000 eventos contados. **(B)** Extrato total das células infectadas foram separados por SDS- PAGE, após correção do conteúdo protéico para 100 μ g por linha, e analisados por Western Blotting para a presença de ADAM10 e seus fragmentos.

5.8- Expressão da metaloproteinase MMP9 secretada, no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*

Após verificar o aumento da expressão das MMPs ADAM10 e MT1-MMP, analisamos a expressão da MMP9, uma metaloproteinase envolvida no padrão de invasividade das células. Como esta metaloproteinase é secretada, utilizamos o sobrenadante da cultura das células após 24h de infecção, que foi concentrado por centrifugação em Centriscart (Sartorius-Stedim Biotech, cut-off 20.000 mw), e imunoprecipitado com proteína G-agarose. As amostras foram avaliadas por zimograma em gel de poliacrilamida com gelatina. Verificamos que a secreção de MMP9 encontrava-se aumentada, e que esta MMP estava em sua forma ativa de 83 KDa nas células infectadas (Figura 20). Nas células ativadas com LPS, a expressão foi similar ao controle e a forma ativa da molécula estava em menor densidade (Figura 20).

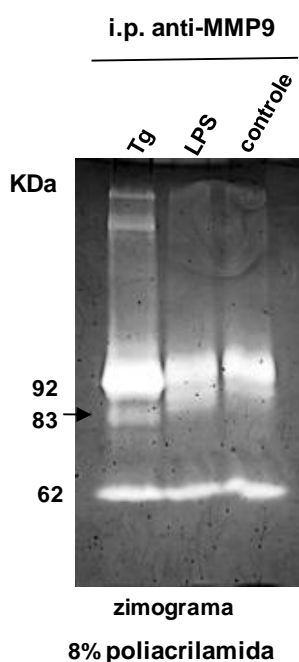


Figura 20- Secreção e atividade de MMP9. Zimografia em gel de poliacrilamida 8% e gelatina 0,1% do sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii*, após imunoprecipitação com anti-MMP9.

5.9- Expressão de CD44 na superfície de macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*

Para a secreção de MMP9 são requeridas moléculas adicionais que fazem parte do complexo de invasividade já identificados em células metastáticas. A expressão de CD44 na superfície das células Raw 264.7 foi avaliada por citometria de fluxo, na presença do inibidor de MEKK (U0126) e de MMP (MMP inibitor I). Verificamos que a infecção com *T. gondii* resultou em diminuição da expressão de CD44, mesmo quando pré ativadas com LPS (Figura 21 A). A inibição da fosforilação de ERK aumentou a expressão de CD44 nas células controle não infectadas e nas ativadas com LPS (Figura 21 B). Esta inibição reverteu parcialmente a regulação negativa da expressão de CD44 em células infectadas (Figura 21 B), enquanto que a inibição da atividade de MMPs levou a um aumento na expressão de CD44 nas células não infectadas (Figura 21 C). Novamente, não foi observada reversão no padrão de expressão nas células infectadas com *T. gondii*, sugerindo que outras proteases poderiam estar envolvidas na liberação de CD44 (Figura 21 C). Nas células controle ou tratadas com LPS na presença do inibidor de MMPs houve aumento na expressão de superfície de CD44 (Figura 21 C).

A presença de CD44 solúvel foi analisada através de imunoprecipitação com anticorpo anti CD44, do sobrenadante da cultura de células infectadas com *T. gondii*, previamente ativadas com LPS ou não, e submetidas a análise por zimograma para presença de atividade de MMP9. Observamos que o CD44 estava complexado a MMP9, uma vez que houve atividade enzimática quando submetidos a análise por zimograma, após precipitação com anti-CD44 (Figura 22). Observamos que houve aumento na ativação de MMP9 em células infectadas com *T. gondii*, através da visualização da banda de 83 KDa (Figura 22).

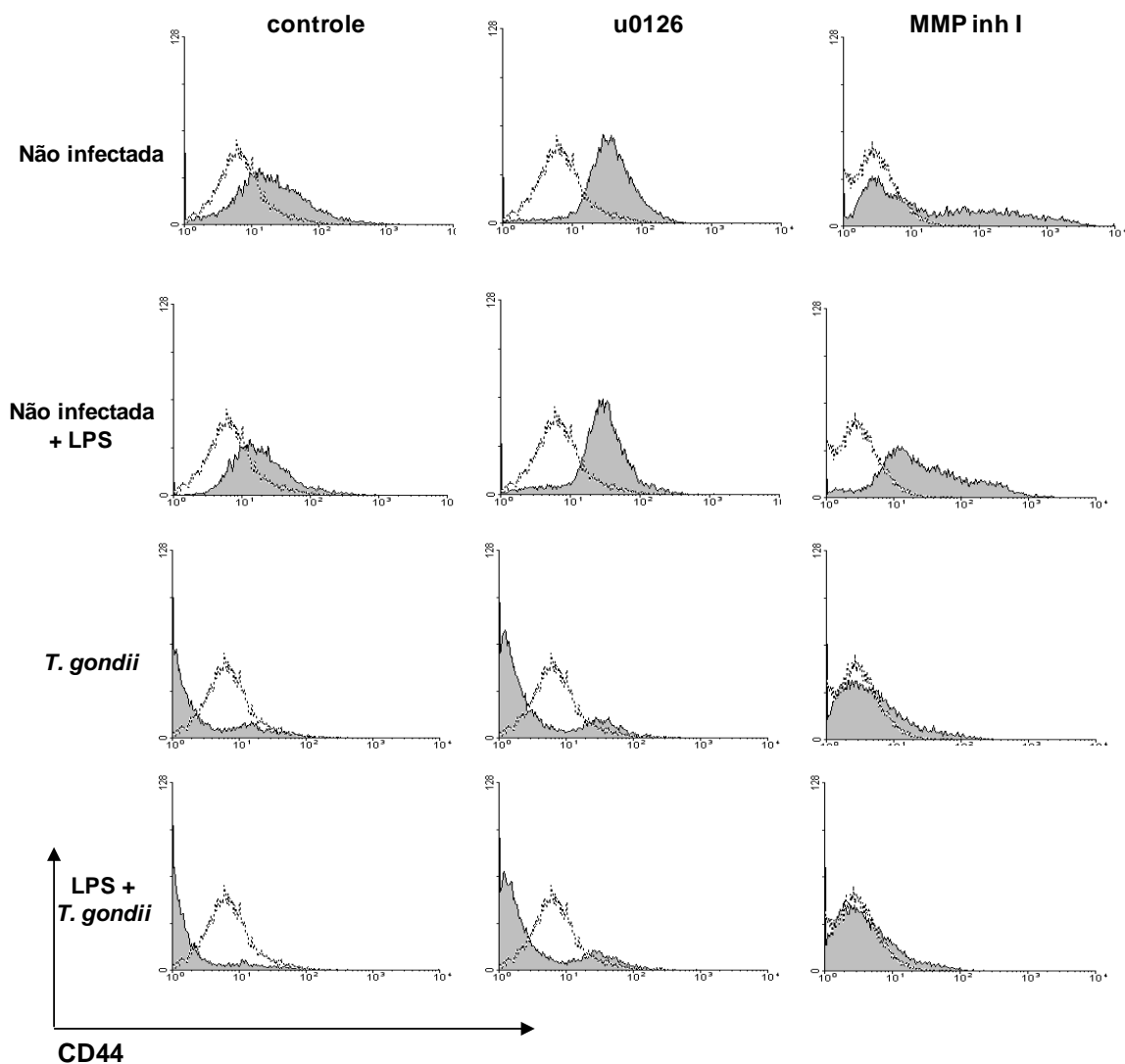


Figura 21- Expressão de CD44 na superfície de células infectadas com *Toxoplasma gondii*. na ausência de inibidores (coluna da esquerda); na presença do inibidor de fosforilação de ERK (u126) (coluna central); na presença do inibidor de MMP (coluna da direita). Histogramas cinza preenchido representam células Raw 264.7 infectadas com *T. gondii* (5:1 parasitos:célula); e histograma cinza pontilhado, representa controle inespecífico de marcação com streptoavidin-PE. Foram analisados 10 mil eventos. Os histogramas são representativos de 3 experimentos com resultados similares.

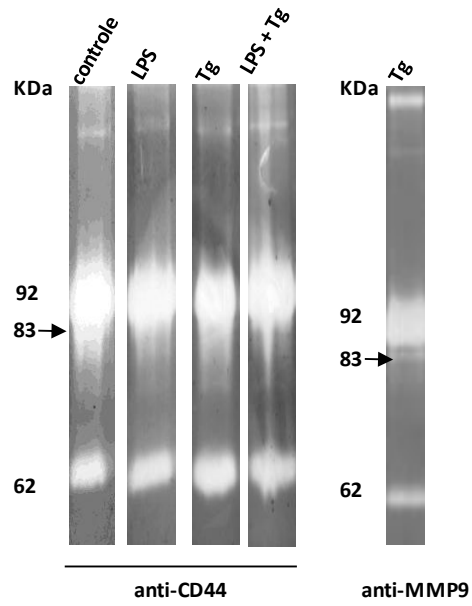


Figura 22- Secreção de CD44 e atividade de MMP9. Zimografia em gel de poliacrilamida 8% e gelatina 0,1% do sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii*, após imunoprecipitação com anti-CD44.

5.10- Expressão das integrinas α_v e β_3 em macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii*

Além das MMPs serem responsáveis pela degradação de ECM e da clivagem do ectodomínio da CD44, elas também estão envolvidas no processamento de formas pró das cadeias α_4 , α_5 e α_v de integrinas. Analisamos então a expressão das integrinas α_v e β_3 em macrófagos infectados com *T. gondii* na presença ou ausência do inibidor de MMPs. Células Raw 264.7 foram infectadas com ou sem prévia ativação com LPS. O inibidor de MMPs foi adicionado 1h após a infecção e as células foram marcadas com anticorpo anti- α_v ou β_3 para verificar sua expressão na superfície celular, utilizando o mesmo sistema de amplificação já descrito. Verificamos que na presença do inibidor de MMPs (MMP inhibitor I) houve decréscimo na expressão de α_v em todos os tratamentos, exceto nas células controle não infectadas (Figura 23 A). Em relação a subunidade β_3 , na presença do inibidor houve redução na expressão para todos os tratamentos, porém esta redução foi mais acentuada nas células infectadas e nas previamente ativadas com LPS e infectadas (Figura 23 B).

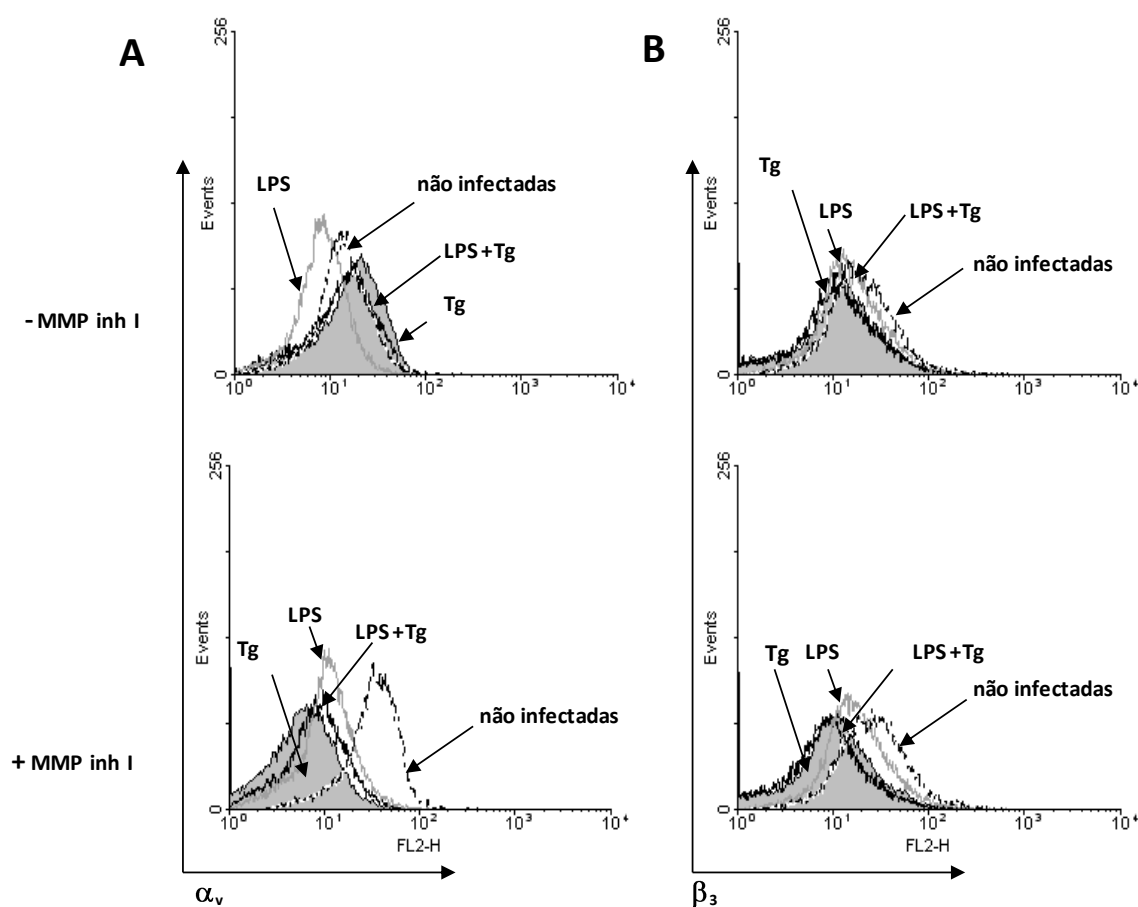


Figura 23- Expressão das integrinas α_v e β_3 por células infectadas com *Toxoplasma gondii* e tratadas com inibidor de metaloproteinases. Células Raw 264.7 foram infectadas (5:1 – parasitos: célula), com e sem prévia ativação com LPS, na presença ou não do inibidor (MMP inhibitor I). 24h após a infecção, as células foram marcadas com anticorpo anti α_v (A) ou β_3 (B) para verificar sua expressão na superfície celular, usando o mesmo sistema de amplificação descrito anteriormente. Histogramas de citometria de fluxo de um experimento representativo entre 4 realizados. 15.000 eventos contados.

5.11- Identificação de metaloproteinases em extrato total de *Toxoplasma gondii*

O extrato total de *T. gondii* foi submetido a SDS-PAGE 12%, e um perfil complexo de múltiplas bandas de massas moleculares variando de 120 a 21,5 KDa foi observado (Figura 24 A). Quando o extrato total foi submetido a zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina, duas bandas foram detectadas, uma de maior intensidade, de aproximadamente 84 KDa, e outra de menor intensidade de aproximadamente 72 KDa. Quando incubados com inibidor de MMPs houve uma inibição da atividade enzimática (Figura 24 B).

As amostras isoladas de *T. gondii* foram submetidas a espectrometria de massa em sistema MALDI TOF/TOF de análise, após extração da proteína de interesse de gel de poliacrilamida preparatório e digestão trípica. Observamos na figura 24 C o espectro da relação carga/massa da mistura de peptídeos extraída. Foi realizada uma análise subsequente em banco de dados Mascot, usando os seguintes parâmetros: MS/MS Ion Search; tripsina; modificações variáveis [(carbamidomethyl (C), Oxidação (M) (HM), propanionamida (C)]; valores de massa monoisotopicos; massa da proteína irrestrita; tolerância peptídeo ± 0.6 Da; tolerância de fragmentação ± 1.2 Da; número máximo de clivagens perdidas de 2; instrumento MALDI TOF/TOF. Na Tabela I estão apresentados os resultados de homologia, sendo que o peptídeo de massa observada de 1450.7286 apresentou alto score de homologia com uma MMP9 de *Notophthalmus viridescens*, que é uma salamandra endêmica da América do Norte e Canadá.

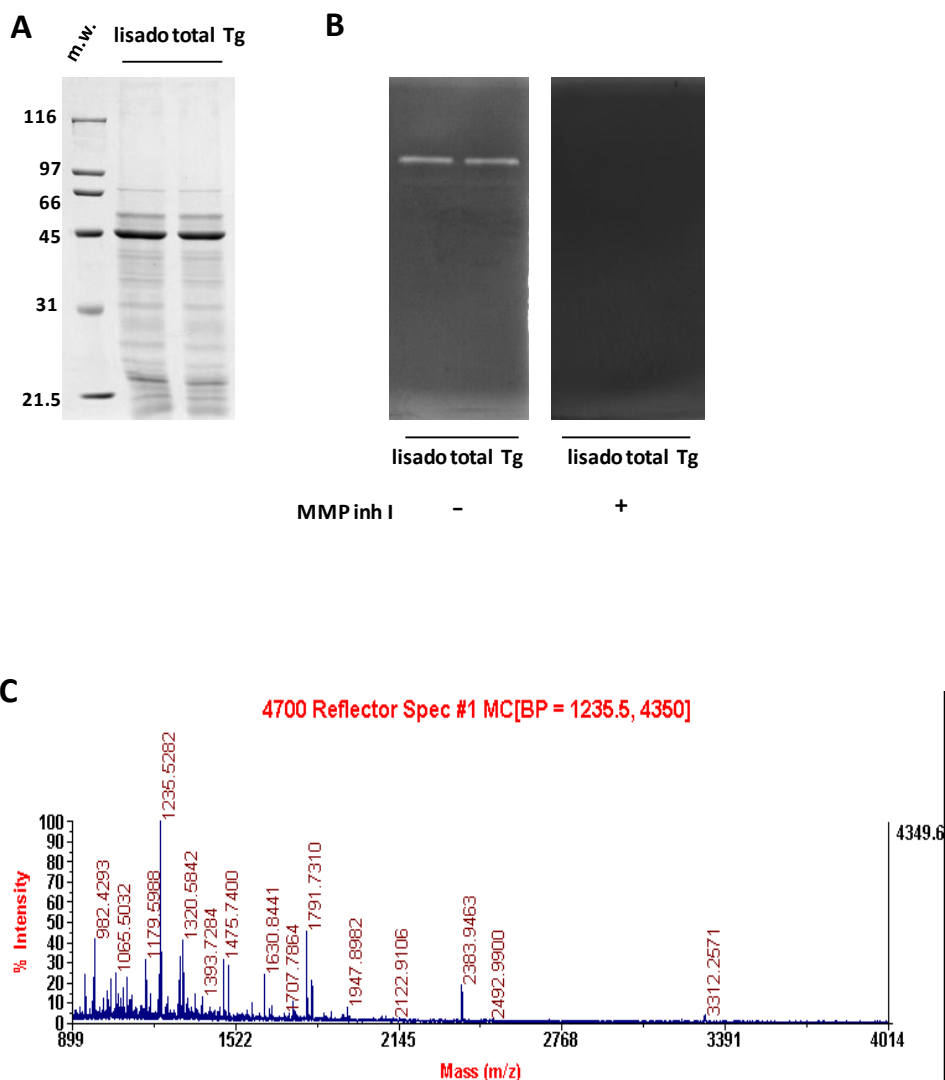


Figura 24- Identificação de MMPs em extrato total de *Toxoplasma gondii*. Extrato total de *T. gondii* foi obtido a partir de taquizoítos da cepa RH, isolados do lavado peritoneal de camundongos Swiss Webster. **(A)** SDS PAGE a 12%; **(B)** Zimograma de extrato total de *T. gondii*, em gel de 10 % de poliácridamida e 0,1 % de gelatina, na presença ou não do inibidor de MMP. **(C)** Identificação das proteínas extraídas do gel, por MALDI TOF-TOF.

Tabela I- Análise por MALDI TOF/TOF e banco de dados Mascot da principal metaloproteinase de *Toxoplasma gondii*

peptídeo	SCORE/ massa observada	Homologia^a
YWKASSARPGAIAK + Oxidation (HW)-	8/ 1450.7286	matrix metalloproteinase 9 [Notophthalmus viridescens]
CGVPDVQHRLR + Propionamide (C)-	4/ 1194.5953	matrix metalloproteinase 12 [Mus musculus]
SAGRGWGAGAGQ	4/1074.5260	Metastasis-suppressor KiSS-1 precursor (Kisspeptin-1) [Contains: Metastin (Kisspeptin- 54); Kisspept

6- Discussão

A infecção com *T. gondii* causa modulação da expressão de moléculas de superfície em leucócitos, possivelmente por citocinas/quimiocinas presentes no ambiente inflamatório ou por regular diretamente as células apresentadoras de antígeno (APCs) (Luder *et al.*, 1998; Denkers & Gazzinelli, 1998). O parasita é também capaz de modular moléculas de superfície dos macrófagos durante o curso da infecção, assim como MHC I e II (Luder *et al.*, 1998).

A análise da capacidade de adesão dos macrófagos murinos infectados com *T. gondii* mostrou que eles desaderem significativamente nas primeiras horas após a infecção, porém, esta desadesão é transitória e as células voltam a aderir após 48 h de infecção, sem no entanto, retornarem aos níveis das células não infectadas. Para verificar se as células estavam desaderindo por estarem mortas ou pela modulação negativa da expressão de moléculas de superfície como as CAMs e integrinas, a viabilidade das células presentes no sobrenadante da cultura foi avaliada, e constatou-se que apesar de soltas, as células permaneciam viáveis. Em um estudo pioneiro realizado pelo nosso grupo, esta modulação já havia sido descrita, quando células J774.A1 (linhagem monocítica murina) ou macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *T. gondii* (Da Gama *et al.*, 2004). A infecção em células humanas ou murinas da linhagem monocítica/macrofágica com *T. gondii*, incapacita estas células de regular positivamente as principais moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86, CD83, CD1a e HLA-DR (Seipel *et al.*, 2009), sugerindo que algumas das células presentes no sítio de infecção tenham a capacidade de estimulação de linfócitos T reduzida, uma vez que o co-estímulo necessário a sua ativação não está presente.

O processo de migração celular envolve múltiplas etapas. A adesão das células leucocitárias ao endotélio vascular ocorre quando estas células recebem estímulos exógenos de citocinas ou quimiocinas produzidas no sítio inflamatório. Estes estímulos ativam nelas mecanismos de sinalização intracelular que resultam na expressão de moléculas de adesão, em sua superfície, para facilitação do seu extravasamento para o tecido (Figura 25). É possível que a desadesão aumentada observada em 24h, seja uma etapa necessária ao processo de transmigração, quando a célula deve alterar entre padrões adesivos ou circulantes. Observamos que macrófagos murinos infectados com *T. gondii* têm a capacidade de migração

aumentada 48 h após a infecção, quando as células recuperam parcialmente a sua capacidade de adesão.

A via ERK de sinalização desempenha papel essencial na indução da motilidade celular. Tanimura e colaboradores demonstraram em 2003, que o estado de ativação de ERK1/2 foi comparável a habilidade de invasão em matrigel em várias linhagens de células tumorais humanas e que esta ativação tem sido relacionada a expressão do gene de MMP9, cuja atividade é requerida para a motilidade celular. Demonstramos o aumento na expressão de ERK1/2 em macrófagos infectados com *T. gondii*, porém como utilizamos um anticorpo que reconhece ERK total, não discriminando entre formas fosforiladas (ativa) ou não da molécula.

Experimentos adicionais devem ser realizados para verificar o padrão de fosforilação de ERK1/2 uma vez que, se esta molécula estiver fosforilada, ela é translocada para o núcleo. Experimentos de imunofluorescência para verificar a localização translocação de ERK 1/2 para o núcleo, foram realizados, sugerindo que nas células infectadas esta molécula encontra-se localizada no núcleo celular (dados não mostrados). Porém, por problemas no estabelecimento de protocolo, as imagens obtidas não foram satisfatórias, e novos reagentes estão sendo adquiridos para finalizar esta etapa.

Quando estes macrófagos infectados foram tratados com inibidor de fosforilação de ERK1/2, eles tiveram sua capacidade de adesão reduzida significativamente nas horas iniciais após a infecção. Curiosamente quando os macrófagos foram tratados com este inibidor antes da infecção com *T. gondii*, eles se tornaram refratários a infecção. Por outro lado, quando o *T. gondii* foi tratado com o inibidor antes de ser adicionado a cultura, a porcentagem de células infectadas diminuiu de maneira menos significativa, comparável ao observado quando as células foram infectadas na presença do inibidor, sugerindo que o inibidor de fosforilação de ERK utilizado esteja interferindo em mecanismos de sinalização da própria célula hospedeira e não no *T. gondii*.

A ativação de várias células do sistema imune é iniciada através do reconhecimento de estruturas específicas ou ligantes na superfície do parasita, conhecidos como PAMPs, que ao se ligarem aos PRRs na superfície de células imune disparam vias de sinalização intracelular, que resultam na indução de genes da resposta imune (Kawai & Akira, 2005). Ensaios de adesão e transmigração

utilizando BMDM de animais deficientes para TLR2 e CD14 foram realizados com a finalidade de avaliar o envolvimento das vias de ativação mediadas por estes receptores, nas quais está incluída a via das MAPK. Observamos que na ausência destas moléculas as células infectadas desaderiram significativamente quando comparadas as células dos animais selvagens. Porém ao analisarmos a capacidade de migração destas células verificamos que na ausência do TLR2 houve uma redução na capacidade migratória induzida pelo *T. gondii*. Taquizoítos de *T. gondii* são completamente recobertos por GPI (glicofosfatidilinositol), o qual é necessário para sua viabilidade (Wichroski & Ward, 2003). Estes Glicanos em sua forma nativa ou em forma de diacilgliceróis isolados de GPI (glicofosfatidilinositol) de *T. gondii* foram capazes de ativar a produção de TNF α e ativação de NF κ B através de TLR2 e TLR4 (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007).

O estabelecimento da infecção toxoplásmica requer que os esporozoítos liberados de oocistos, ou bradizoítos liberados de cistos, ingeridos acidentalmente, penetrem nas células epiteliais, e se convertem em taquizoítos. Esta forma do parasita deve ser capaz de cruzar barreiras biológicas e se disseminar para órgãos distantes via sistema linfático ou sanguíneo (Hunter & Remington, 1994). A forma pela qual os parasitas residem no interior de leucócitos, sem serem destruídos, e alcançam sítios imunoprivilegiados através da transmigração pela BBB em um mecanismo de entrada facilitada, ou por transmigração direta do parasita livre, começa agora a ser elucidado. Vários grupos tem demonstrado que o *T. gondii* é capaz de infectar macrófagos, monócitos, e DCs murinos (Da Gama *et al.*, 2004; Courret *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2006) e utilizá-los como “cavalo de Tróia” para se disseminar pelo hospedeiro. A regulação da expressão de MMPs de membrana ou de secreção, de integrinas e de outras moléculas associadas é fundamental durante este processo.

Analisamos a importância das MMPs na adesão das células, adicionando um inibidor de MMPs ao sistema. Verificamos que o inibidor diminui a capacidade de adesão das células infectadas com *T. gondii*. Para avaliarmos se este inibidor estava interferindo nas MMPs da célula hospedeira ou do parasita, incubamos cada um separadamente com o inibidor, nas mesmas concentrações molares. Constatamos que quando o *T. gondii* foi pré tratado com o inibidor, antes da infecção, ele teve sua capacidade de infecção significativamente reduzida. Várias MMPs estão envolvidas no processo de migração e se co-localizam no pólo anterior ou posterior de migração

das células, com diferentes tipos de moléculas. As MMPs são importantes modificadoras do ambiente pericelular, dirigindo a migração através da degradação de componentes da ECM, especialmente de colágeno. Em conjunto com MMPs secretadas, elas abrem caminho para a migração de células através dos tecidos ou da membrana basal. A inibição de MMPs em macrófagos infectados pelo *T. gondii* levou ao bloqueio da migração *in vitro* através do matrigel após 48 h de infecção. Demonstramos aumento nos níveis de MT1-MMP e ADAM10 na superfície celular de macrófagos infectados com *T.gondii*. A MT1-MMP e a ADAM10, assim como outras MMPs, são produzidas como pro-proteínas e requerem a remoção do pro-peptídeo inibidor por proteólise (Murphy & Nagase, 2008). O pro-peptídeo inibidor de MT1-MMP é clivado por furinas ou pro-proteína convertases relacionadas (Takino *et al.*, 2006) no aparato de Golgi (Mazzone *et al.*, 2004) e somente alcança a superfície celular na sua forma ativa. ADAM10 é co-localizada com seu pro-domínio inibidor, em condições fisiológicas nas vesículas trans-Golgi, e as formas ativas são geradas por pro-proteína convertases e furinas (Anders *et al.*, 2001).

Análises de extratos totais de células mostraram que a forma processada de MT1-MMP estava aumentada em células infectadas com *T. gondii*, e que o estímulo a macrófagos com LPS antes da infecção aumentou ainda mais o acúmulo desta forma molecular. Além disso, o pro-domínio inibidor de ADAM10 foi observado em macrófagos previamente tratados com LPS e infectados.

Foi demonstrado, a co-localização MT1-MMP, uma MMP transmembrana, com a integrina $\alpha v \beta 3$ e com uPAR na extremidade anterior da célula (Stefanidakis & Koivunen, 2006). O CD44 também se localiza no pólo anterior de migração de muitos tipos celulares, incluindo neutrófilos em migração (Alstergren *et al.*, 2004) e osteoclastos (Samanna *et al.*, 2007).

A MMP transmembrana, MT1-MMP, em conjunto com a ADAM10 possuem papel relevante no direcionamento da migração, via liberação de CD44 (Kajita *et al.*, 2001; Anderegg *et al.*, 2008 e Murphy & Nagase, 2008). O CD44 é uma glicoproteína transmembrana tipo I que está envolvida na interação célula-célula e célula-ECM, ligando-se a osteopontina (Rangaswami *et al.*, 2006), e participando em muitos processos celulares como crescimento, sobrevivência, diferenciação e motilidade. O CD44 e a integrina $\alpha 4 \beta 1$ formam um complexo na superfície celular e funcionam como uma estrutura de ancoragem para a pro-MMP9 (Redondo-Muñoz *et al.*, 2008), uma MMP secretada que é essencial para o comportamento invasivo da

célula. Nós observamos que a infecção pelo *T. gondii* aumentou a secreção da forma ativa de MMP9, sugerindo que esta MMP também é fundamental para a migração de macrófagos infectados.

Tem sido relatado que a liberação de CD44 por MT1-MMP envolve a via ERK de ativação (Takino *et al.*, 2006). A avaliação da expressão de CD44 na superfície celular mostrou que a infecção com *T. gondii* diminui a expressão desta molécula, e que esta diminuição foi apenas parcialmente revertida pelo bloqueio da fosforilação de ERK. A inibição da atividade de MMPs aumentou a expressão de CD44 em células não infectadas, porém macrófagos infectados permaneceram sem expressão desta molécula. O tratamento com LPS na presença do inibidor de MMPs também levou ao aumento dos níveis de CD44, e a subsequente infecção com *T. gondii* diminuiu a expressão desta molécula. Experimentos adicionais de imunoprecipitação com anti-CD44, seguido de zimografia, foram realizados para demonstrar a presença de CD44 solúvel. Verificamos que a infecção com *T. gondii* promove a liberação do domínio externo desta molécula e que ela encontra-se aumentada no sobrenadante das células infectadas e encontram-se associadas a forma ativa de MMP9, responsáveis por este evento. Entretanto, a identificação de MMP9 solúvel no sobrenadante da cultura de macrófagos infectados com *T. gondii* sugere que a MMP9 poderia ser secretada através da liberação de CD44, como observado em outros processos patológicos e em condições fisiológicas (Samanna *et al.*, 2007 e Redondo-Muñoz *et al.*, 2008).

O inibidor utilizado nos experimentos aqui relatados, pertence a uma classe de inibidores de MMPs de amplo espectro, contudo é possível que outras MMPs não estudadas aqui e proteases de outras classes, como serino proteases, também estejam envolvidas nestes processos. Experimentos realizados com fibroblastos cardíacos, demonstraram que a furina, uma pro-proteína convertase, ativa TGF β 1 e MT1-MMP, as quais facilitam a ativação de pro-gelatinases, portanto a furina desempenha um papel central e deveria ser considerada um dos alvo no remodelamento de tecido (Stawowy *et al.*, 2004). De forma a discriminarmos entre estas diferentes vias, inibidores da via das furino/pro-proteínas convertase serão utilizados, dando prosseguimento a investigação aqui iniciada. Além disso, para precisar de forma específica o papel de MT1-MMP, ADAM10, MMP9, nos processos migratórios das células infectadas, deveremos utilizar a inibição da expressão destas proteínas através da metodologia de siRNA.

Buache e colaboradores mostraram, em 2007, que células THP1 infectadas com *T. gondii* secretam quantidades diminuídas de pro-MMP2 e pro-MMP9. Nós inserimos dois passos adicionais antes da zimografia (concentração de meio condicionado e imunoprecipitação com anti-MMP9) que nos permitiu melhorar a visualização da atividade enzimática. Baseado em nossos resultados, nós sugerimos que o padrão de diminuição observado pelos autores poderia ser devido ao aumento na quantidade de MMP9 em sua forma ativa.

Apesar do seu papel em modificar o espaço pericelular, as MMPs também são mediadoras da maturação de integrinas, convertendo cadeias pro- α tornando-as disponíveis para interagirem com cadeias β . A integrina $\alpha v \beta 3$ é fundamental para as células atravessarem a BBB e ela também é capaz de regular a ligação de $\alpha 2 \beta 1$ a fibronectina e a conversão de pro- αv para a subunidade matura de αv . Esta conversão é mediada pela MT1-MMP em células de carcinoma de mama (Baciu *et al.*, 2003), mas é usualmente realizada por furinas ou pro-proteína convertases (Bassi *et al.*, 2005). Infecção de macrófagos murinos com *T. gondii* não interferiu inicialmente na expressão de αv ou $\beta 3$ na superfície das células. Entretanto, na presença do inibidor de MMP tipo I, células infectadas com *T. gondii* falharam em expressar níveis normais de αv na superfície celular. Por outro lado, células não infectadas exibiram altos níveis de αv e $\beta 3$, indicando que a via das furinas/ proteína convertases foi utilizada para converter αv na sua forma matura (Mayer *et al.*, 2008).

A via da MT1-MMP tem sido apresentada como uma via alternativa para o processamento de subunidades pro- αv por pro-proteína convertases. Além disso, nós não podemos excluir o processamento de pro- αv na sua forma matura pelas MMPs do parasito. Em conjunto, os resultados descritos aqui sugerem que MT1-MMP, ADAM10, CD44, MMP9 e $\alpha v \beta 3$, fazem parte da maquinaria migratória da célula hospedeira, observada em vários mecanismos fisiológicos e patológicos que envolvem migração. Esta maquinaria parece ser regulada durante a infecção pelo *T. gondii* e poderia facilitar o acesso de leucócitos infectados a sítios imunoprivilegiados.

Baseado nos resultados do nosso grupo de pesquisa e em dados da literatura científica, apresentados nesta tese, propusemos um modelo para a regulação do complexo de migração de macrófagos induzida pelo *T. gondii*. As MMPs secretadas pelo *T. gondii* se ligam ao complexo receptor UPAR/ $\alpha 5 \beta 1$ e ativam a ERK1/2 pela via das MAPK, que induz o aumento na expressão e ativação das MMP9 e MT1-MMP.

Estas por sua vez, serão direcionadas a superfície celular, na qual se acoplam ao complexo UPAR/ $\alpha 5\beta 1$, permitindo a associação da molécula de CD44 e de outras MMPs como a ADAM10 (Figura 25: Etapa 1/3). A concentração de ADAM10 e MT1-MMP junto a este complexo no pólo frontal de migração da célula, permite a clivagem do ectodomínio de CD44 e a sua liberação complexado a MMP9 (sCD44/MMP9) com degradação da ECM (Figura 26: Etapa 2/3). Este processo ocorre em cascata, levando a ativação de mais MT1-MMP e ADAM10 e de TgMMPS e a remontagem continuada do complexo de migração na superfície celular, com conversão de formas pro- αv de integrinas em sua forma ativa (αv) que juntar-se-ão ao complexo de migração celular, permitindo a continuidade do processo (Figura 27: Etapa3/3).

7- CONCLUSÃO

Foi identificada uma MMP do *T. gondii*, semelhante a MMP9 que parece estar envolvida no processo de penetração ativa do parasito na célula hospedeira.

A infecção com *T. gondii* parece inibir o processo de maturação de integrinas $\alpha\beta3$ pela via das furino/Pró-proteína convertases.

Em conjunto, os resultados descritos aqui sugerem que MT1-MMP, ADAM10, CD44, MMP9 e $\alpha\beta3$, fazem parte da maquinaria invasiva da célula hospedeira, observada em vários mecanismos fisiológicos e patológicos envolvendo migração, são reguladas durante a infecção pelo *T. gondii* e podendo facilitar o acesso de leucócitos infectados a sítios imunoprivilegiados.

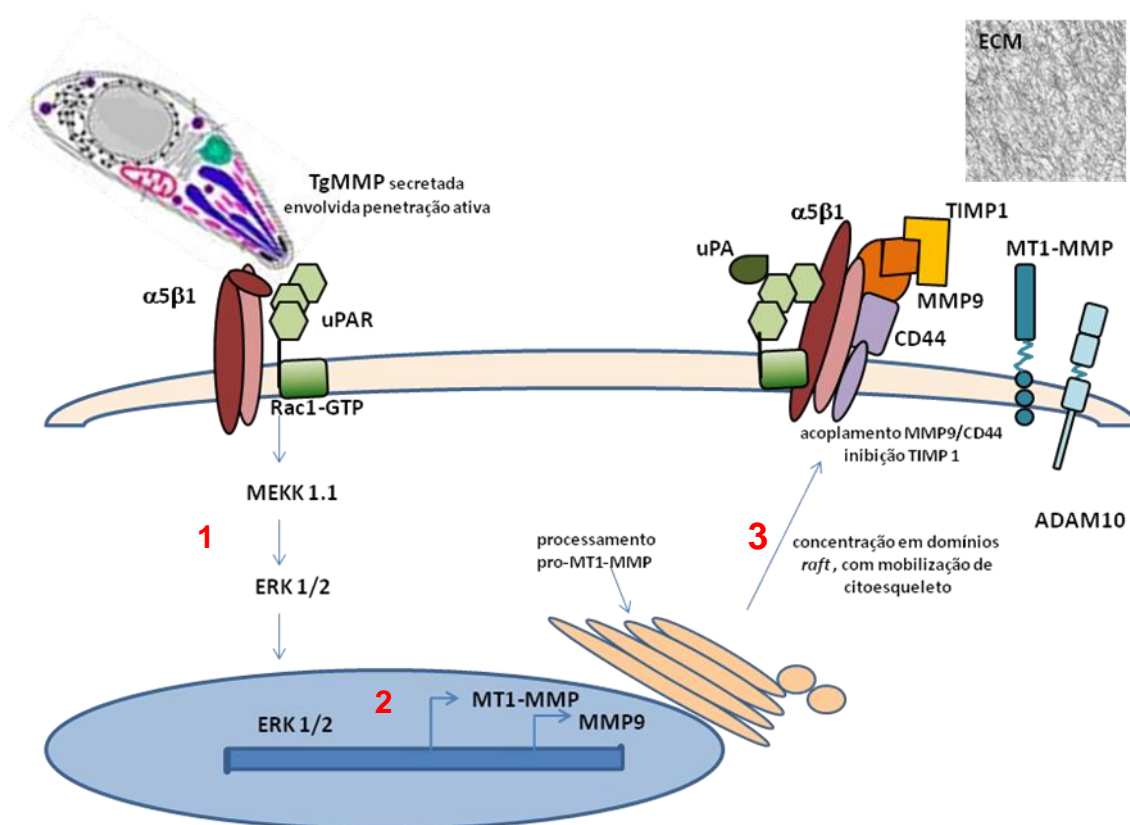


Figura 25- Etapa 1/3 da regulação do complexo de migração da célula hospedeira induzida pelo *Toxoplasma gondii*. 1) Ativação da via das MAPK por proteínas do *Toxoplasma gondii*; 2) Aumento na expressão dos genes de MT1-MMP e MMP9 e ativação destas enzimas; 3) Formação do complexo de migração, constituído por: CD44, ADAM10, MT1-MMP e MMP, na superfície celular.

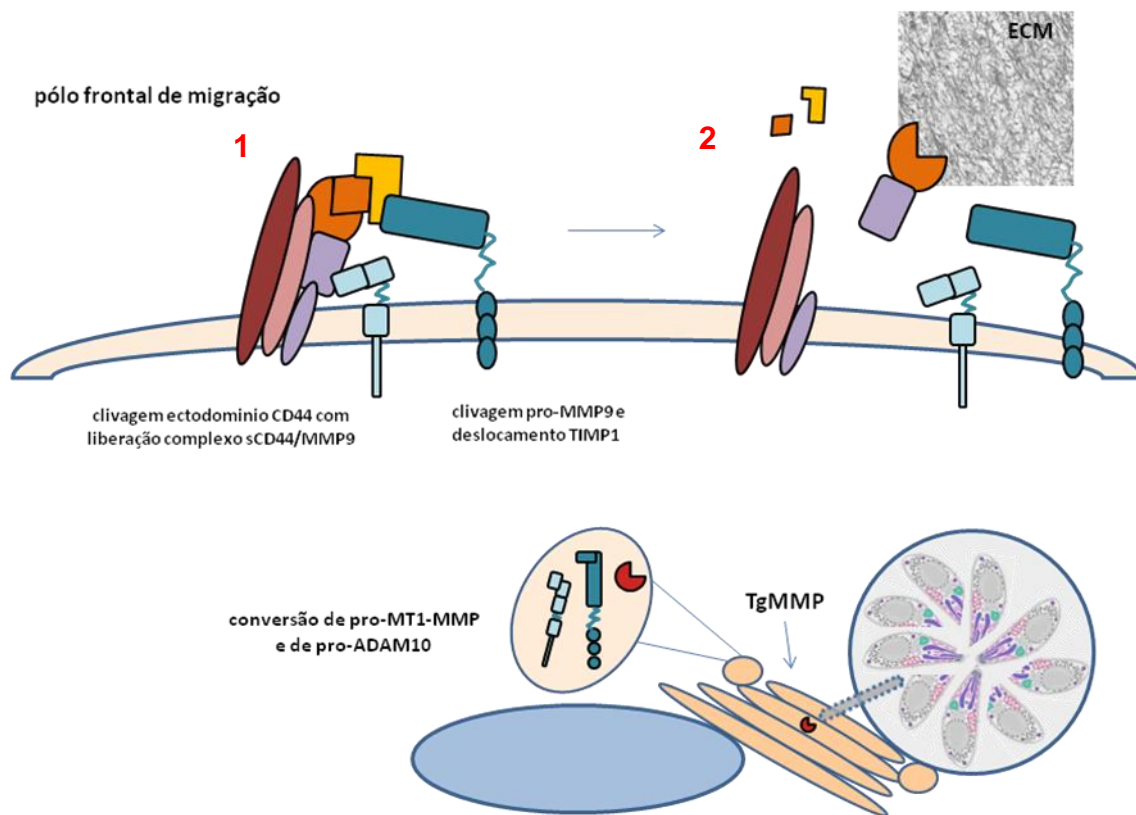


Figura 26- Etapa 2/3 da regulação do complexo de migração da célula hospedeira induzida pelo *Toxoplasma gondii*. 1) Concentração de ADAM10 e MT1-MMP no pólo frontal de migração e clivagem do ectodomínio de CD44 2) Liberação do complexo sCD44/MMP9 e degradação da ECM.

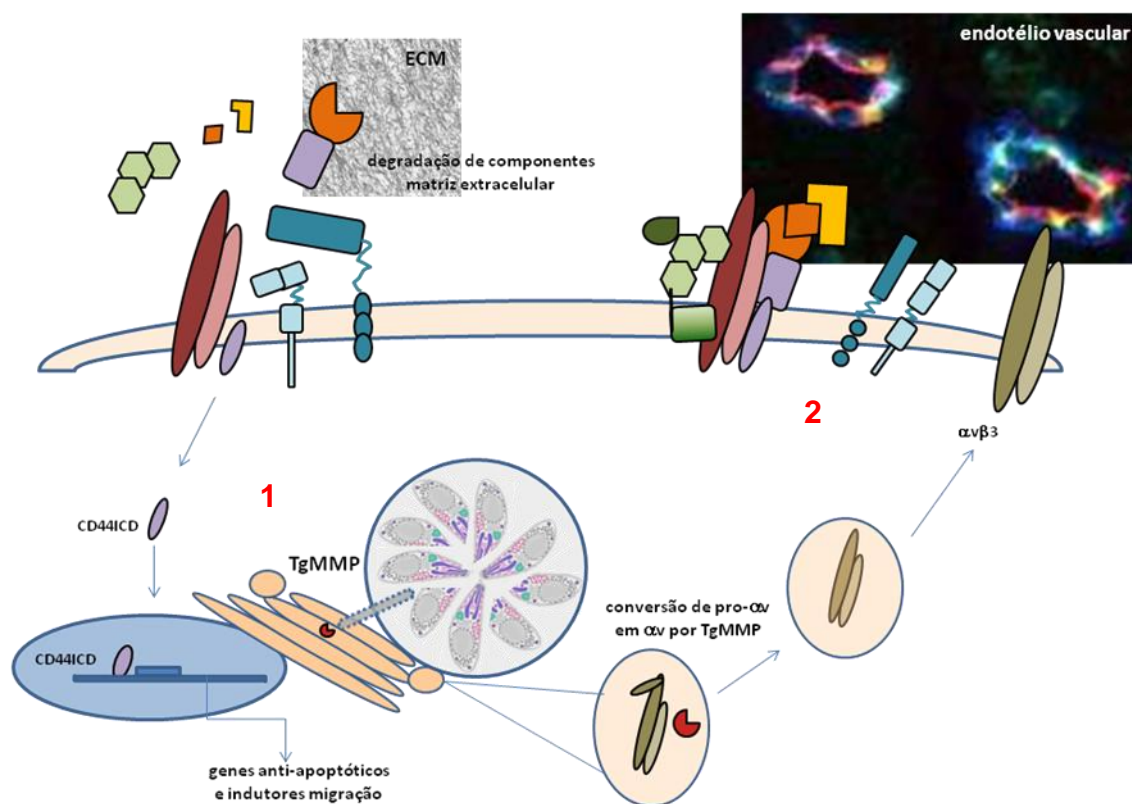


Figura 27- Etapa 3/3 da regulação do complexo de migração da célula hospedeira induzida pelo *Toxoplasma gondii*. 1) Processamento e ativação de pro- αv em sua forma ativa (αv), por metaloproteinases do *Toxoplasma gondii*; 2) re-montagem continuada do complexo de migração na superfície celular.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today*. 1993; 9(2):61-3

Ahmed AK, Mun HS, Aosai F, Piao LX, Fang H, Norose K, Yano A. Roles of *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 in host defense against *T. gondii* infection. *Microb. Immunol*. 2004; 48: 911–915;

Alexander J and Hunter CA. Immunoregulation during toxoplasmosis. In.: *Immunology of intracellular parasitism*. Chem. Immunol. Basel, Karger. 701:81-102, 1998;

Alstergren P, Zhu B, Glougauer M, Mak TW, Ellen RP, Sodek J. Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell surface expression of CD44. *Cellul. Immunol*. 2004; 231: 146–157;

Anderegg U, Eichenberg T, Parthaune T, Haiduk C, Saalbach C, Milkova L, Ludwig A, Grosche J, Gebhardt C, Voelcker V, Sleeman JP, Simon JC. ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells, *J. Invest. Dermatol*. 2008; 112: 263–273;

Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J*. 2001; 15: 1837–1839;

Araujo F, Slifer T, Kim S. Chronic infection with *T. gondii* does not prevent acute disease or colonisation of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J. Parasitol*. 1997; 83: 521±2;

Baciu PC, Suleiman EA, Deryugina EL, Strongin AY. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro α v integrin regulates cross-talk between α v β 3 and α 2 β 1 integrins in breast carcinoma cells, *Exp. Cell Res*. 2003 ; 291 : 167–175 ;

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(1):55-62;

Barrat-Boyes SM, Zimmer MI, Harshyne LA, Meyer EM, Watkins SC, Capuano S 3rd, Murphey-Corb M, Falo LD Jr, Donnerberg AD. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol*. 2000; 164(5):2487-95;

Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, Klein-Szanto AJ. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression, *Mol. Carcinog*. 2005; 44: 151–161;

Beckers CJM, Dubremetz JF, Mercereau-Puijalon O, Joiner KA, *Toxoplasma gondii* protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.*1994; 127: 947-961;

Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 20–26;

Blobel CP. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 606–12;

Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878:73-91;

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477:267–83;

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 207–14;

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 1996;85:683–93;

Buache E, Garnotel R, Aubert D, Gillery P, Villena I. Reduced secretion and expression of gelatinase profile in *Toxoplasma gondii*-infected human monocytic cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 359: 298–303;

Busiek DF, Baragi V, Nehring LC, Parks WC, Welgus HG. Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *J Immunol* 1995; 154: 6484–91;

Butcher BA and Denkers EY. Mechanism of Entry Determines the Ability of *Toxoplasma gondii* To Inhibit Macrophage Proinflammatory Cytokine Production . *Infect Immun.* 2002; 70(9): 5216–5224;

Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell. Microbiol.* 2006; 8: 535–544;

Campbell EJ, Cury JD, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Neutral proteinases of human mononuclear phagocytes. Cellular differentiation markedly alters cell phenotype for serine proteinases, metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Immunol* 1991; 146: 1286–93;

Cauwe B, Van den Steen PE, Opendakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42: 113–85;

Cayrol R, Wosik K, Berard JL, ADodelet-Devillers, Ifergan I, Kebir H, Haqqani AS, Kreymborg K, Krug S, Moumdjian R, Bouthllier A, Becher B, Arbour N, David S, Stanimirovic D, Prat A. Adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily are crucial effectors of leukocyte trafficking into the central NE, *Nature Immunology*. 2008; 9: 137–145;

Chao CC, Gekker, Peterson PK. Human microglial defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J Immunol.*, 1994; 152: 1246;

Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 515–9;

Cornelissen AWCA, Overdulve, JP, Van der Ploeg M. Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, and *Plasmodium berghei*, with special reference to gametogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitol.* Vol.88: 531-553, 1984;

Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni D, Gâtel D, Tardieux I. CD11c and CD11b expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain, *Blood* 2006; 107: 309–316;

Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães U Jr, Arnholdt ACV. Reduction of adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 2004; v. 6 (14):1287-1296;

Dallasta LM, Pisarov LA, Esplen JE, Werley J V, Moses AV, Nelson JA, and Achim CL. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 1915–1927;

Debierre-Grockieo F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2007; 179(2):1129-37;

Del Maschio A, De L A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, and Dejana E. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1351–1356;

Denkers E and Gazzinelli RT. Regulation and function of T cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin. Microbiol. 1998.Rev, 569-588;

Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L. Manipulation of mitogenactivated protein kinase/nuclear factor- κ B-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. Immunol. Rev. 2004; 201: 191–205;

Desmonts G and Couvrer J. Congenital Toxoplasmosis. A prospective study of 378 Pregnancies. New England J. Med.1974; 4(290):1110-1116;

Dhawan S, Weeks BS, Soderland C *et al.* HIV-1 infection alters monocyte interactions with human microvascular endothelial cells. J Immunol 1995; 154 :422–32;

Dobbin CA, Smith NC, Johnson AM. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF- κ B and nitric oxide. J. Immunol. 2002; 169: 958–965;

Dreverts DA and Leenere PJM. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into central nervous system. Microbes and Infection 2002; 2:1609-1618;

Dubey JP and Beattie., CP.. Toxoplasmosis of animals and man. 1988. CRC, Boca Raton;

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and stage conversion in mice fed with *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasitol. 1997; 83:870-882;

Dubey JP. Toxoplasma, Hamondia, Besnoitia, Sarcocystis, and other tissue forming coccidian of man and animals. In.: Keir JP (ed) Parasitic Protozoa. Academic, New York, 1977; p.: 101-237;

Dubois B, Starckx S, Pagenstecher A, Oord J, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. Eur J Immunol 2002; 32: 2163–71;

Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, Parks WC. Pro-collagenase-1 (matrixmetalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. J Biol Chem. 2001; 276:29368–74;

Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS.The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease.Clin Exp Immunol. Review 2005; 142(1):12-20;

Feinstein DL, Galea E, Reis DJ. Suppression of glial nitric oxide synthase induction by heat shock: effects on proteolytic degradation of I κ B- α . Nitric oxide 1997; 1: 167–176;

Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanita. 2004;40(1):71-80;

Fortier B, AõËssi E, Ajana F, Dieusart P, Denis P, Martin de Lasalle E, Lecomte-Houcke M, Houcke M, Vinatier D.. Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. Lancet 1991; 338, 444;

Frenkel JK. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology, and immunology, in the coccidia, Hammond DM and Long PL., Eds., University Park Press, Baltimore, 343, 1973;

Furtado GC, Slowik S, Kleinman HK, Joiner KA. Laminin binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophages cells. 1992. Infect. Immun. 60(6):2337-2342;

Gazzinelli RT, Denkers EY, Sher A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity to intracellular parasites. Infec Ag. Dis. 1993; 2:139-149;

Gazzinelli RT, Wysoca M, Hieny S, et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by over production of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. J Immunol. 1996;157(2):798-805;

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nat Rev Immunol. Review. 2006; 12: 895-906;

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature 1994; 370: 555-57;

Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, Buffolano W, Stanford MR, Petersen E; for The European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. PLoS Negl Trop Dis. 2008; 2(8):e277v;

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J Biol Chem 1996; 271(48):30375-30380;

Gross U, Bohne W, Soête M, Dubremetz JF. Developmental Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitology Today 1996; 12: 30-33;

Harris JE, Nuttall RK, Elkington PT, Green JA, Horncastle DE, Graeber MB, Edwards DR, Friedland JS. Monocyte-astrocyte networks regulate matrix metalloproteinase gene expression and secretion in central nervous system tuberculosis in vitro and in vivo. J Immunol. 2007; 178(2):1199-207;

Hunter CA, Remington JS. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis, *J. Infect. Dis.* 1994; 170: 1057–1067;

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992. 69, 11–25;

Israelsk DM and Remington JS. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 1993. 13:322-356;

Itoh YY, Seiki M. MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation, *Trends Biochem. Sci.* 2004; 6: 285–289.;

Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration, *J. Cell Biol.* 2001; 153: 893–904;

Kasper and Boothroyd. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections 1992. 3a. ed. Blackwell Scientific Publications. Ed. Kenneth S. Warren;

Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17: 338–344;

Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(7):546-59. Review

Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, and McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J. Pathol.* 2003; 201: 319–327;

Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994; 269 :22027–33;

Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 2003; 170: 6244–9;

Lambert H, Hitzinger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination, *Cell Microbiol.* 2006 ; 8 : 1611–1623 ;

Lo EH, Wang X, and Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69: 1–9;

Luder CG, Lang T, Beuerle B, Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Clinical Experimental Immunology* 1998; 112 (2): 308;

Luft BJ and Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15:211-222;

MacCormick C, Craig A, Roberts D, Newbold C and Berendt R.. Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultures human microvascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:2521-2529;

Martin EL, Moyer BZ, Pape MC, Starcher B, Leco KJ, Veldhuizen RA. Negative impact of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 null mutation on lung structure and function in response to sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L1222–32;

Mayer G, Hamelin J, Asselin MC, Pasquato A, Marcinkiewicz E, Tang M, Tabibzadeh S, Seidah NG. The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. 2008; 283(4):2373-84;

Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cão J, Zucker S, Luini A, Buccione R. Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains, *J. Cell Science.* 2004; 117: 6275–6287;

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol. Review* 1997; 9(1): 4-9;

Melendez-Zajgla J, Del Pozo L, Ceballos G and Maldonado V. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-4. The road less traveled. *Molecular Cancer.* 2008; 7:85;

Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 1994; 269: 21322–9;

Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 23-39. Epub 2008 Aug 22;

Miltenburg AM, Lacraz S, Welgus HG, Dayer JM. Immobilized anti-CD3 antibody activates T cell clones to induce the production of interstitial collagenase, but not tissue inhibitor of metalloproteinases, in monocytic THP-1 cells and dermal fibroblasts. *J Immunol* 1995; 154 :2655–67;

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004; 363, 1965–1976;

Mordue D, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on basis of their membraneanchoring. J.Exp. Med 1999 ; 190(12):1783-92;

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research, Mol. Aspects Med. 2008; 29: 290–308;

Noel A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. Semin Cell Dev Biol 2008; 19(1):52-60;

Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. Lymphokine Cytokine Res 1991; 10: 317–24;

Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Volk B, Campbell IL. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. Am J Pathol 2000; 197–210;

Plumb J, McQuaid S, Mirakhur M, and Kirk J. Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. Brain Pathol. 2002; 12:154–169;

Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas H, Ln Suffredini AF. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20: 458–64;

Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression, Trends Cell Biol. 2006; 16: 79–87;

Ray L. Parasitologia seg. Ed. Copyright 1991 Guanabara Koogan. Pp96;

Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G, Terol MJ, Garcia-Pardo A. A, $\alpha 4\beta 1$ integrin 190kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP9 in chronic leukemic but not in normal B cell, Blood. 2008; 112: 169–178;

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA., Khazen S, Dijkstra CD, and de Vries H.. Diapedesis of monocytes is associated with MMPmediated occludin disappearance in brain endothelial cells. The FASEB Journal. 2006; 20 (14):2550-2;

Reunanen N, Westermarck J, Hakkinen L, Holmstrom TH, Elo I, Eriksson JE, Kahari VM. Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1998; 273: 5137–45;

Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 205–16;

Samanna V, Ma T, Mak TA, Rogers M, Chellaiah MA. Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP9 activation and osteoclast function, *J. Cell Physiol.* 213 (2007) 710–720;

Scanga CA, Alibert J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denker EY, Medzhitov R, Sher A, Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 2002;168: 5997–6001;

Scott P and Hunter CA. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Current Opinion in Immunology.* 2002; 14: 466-470;

Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004; 324: 744–752;

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

Seipel D, Ribeiro-Gomes FL, Barcelos MW, Ramalho AV, Kipnis TL, Arnholdt ACV. Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability. *APMIS* 2009. 117: 672-680;

Siano JP, Grady KK, Miller P and Wick JM. *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to α (v) β 3 on human microvascular endothelial cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59:77-79;

Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol.* 1998;161(3):1083-1086;

Speidl WS, Toller WG, Kaun C *et al.* Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB J* 2004; 18: 603– 5;

Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Graf K. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase. *Cardiovasc Res.* 2004; 63(1):87-97;

Stefanidakis M, Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression, *Blood* 2006; 108: 1441–1450;

Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008; 1(27):re6

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; Review 17:463-516;

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH *et al.* Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17–producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology*; 2006; 6:937-945;

Takino T, Watanabe Y, Matsui M, Miyamori H, Kudo T, Seiki M, Sato H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration, *Exp. Cell Res.* 2006; 312: 1381–1389;

Tanimura S, Asato K, Fujishiro S, and Kohno M. Specific blockade of the ERK pathway inhibits the invasiveness of tumor cells: down-regulation of matrix metalloproteinase-3/-9/-14 and CD44. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 304: 801–806;

Torii K, Iida K, Miyazaki Y *et al.* Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 43–6;

Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP. Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1991; 88:1656–62;

Van den Steen PE, Van Aelst I, Starckx S, Maskos K, Opdenakker G, Pagenstecher A. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria. *Lab Invest.* 2006; 86(9):873-88;

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:5578–82;

Veronesi R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1990 Parte 7- 8ª. Ed. Copyright;

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003; 92:827-39;

Wahl LM, Corcoran ME, Mergenhagen SE, Finbloom DS. Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN γ blocks endogenous prostaglandin E2-dependent collagenase production. J Immunol 1990; 144 : 3518–22;

Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM, Goldberg GI. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. J Clin Invest 1990; 86:1496–502;

Wichroski, M. J., and G. E. Ward. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol is essential to the survival of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Eukaryot. Cell. 2003; 2: 132–1136;

Wong S and Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin. Infec. Dis. 1994; 18:853-862;

Worthylake RA and Burridge K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating underlying molecular machinery. Curr. Opin. Cell Biology 2001; 13:569-577;

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

Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 2006. 36, 255–259;

Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. Nat Rev Neurosci 2005; 6: 931–44;

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, and Edwards DR. 1998 Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. Trends Neurosc.1998; 21:75-80;

Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of the Dissemination in the Host Tissues during the Acute Phase of Infection of Mice and Rats. *Experimental Parasitology*. 1998; 90: 86-94.

Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability

DANIELE SEIPEL,¹ FLAVIA LIMA RIBEIRO-GOMES,¹ MICHELLE WILLMEN BARCELOS,² ANDRÉ VILLAÇA RAMALHO,¹ MILTON M. KANASHIRO,¹ THEREZA LIBERMAN KIPNIS^{1*} and ANDREA CRISTINA VETO ARNHOLDT¹

¹Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense; and ²Hospital Geral de Guarus, PMCG; Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Seipel D, Ribeiro-Gomes FL, Barcelos MW, Ramalho AV, Kanashiro MM, Kipnis TL, Arnholdt ACV. Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability. APMIS 2009; 117: 672–80.

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that is able to disseminate into deep tissues and cross biological barriers, reaching immunoprivileged sites such as the brain and retina. The parasite is able to infect macrophages and dendritic cells and use them for dispersal throughout the body, but the activation state of those cells is unknown. We investigated the ability of human and murine cells from monocytic/macrophage lineages that had not previously been exposed to inflammatory cytokines to up-regulate co-stimulatory and adhesion molecules upon infection. *Toxoplasma gondii*-infected human monocytes (freshly isolated and THP1 lineage) were unable to up-regulate CD86, CD83, CD40 or CD1a. CD80 expression increased in infected cells but expression of L-selectin and $\beta 2$ integrin was unaltered. We evaluated the ability of infected macrophages from wild type C57/BL/6 or CD14^{-/-} mice to migrate in 8 μ m transwells. Infected cells from CD14^{-/-} mice were more likely to de-adhere than infected cells from wild type mice but they did not show any increase in migratory ability. The non-stimulatory profile of these infected cells may contribute to parasite spread throughout the lymphatic circulation in the initial phases of infection.

Key words: *T. gondii*; CD80; L-selectin; $\beta 2$ integrin; migration.

Andrea Arnholdt, Av. Alberto Lamego, 2000, LBR 210/P4, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, CEP 28015-620, Brazil. e-mail: arnholdt@uenf.br

*In Memoriam

Toxoplasmosis is caused by the obligate intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, which has a complex life cycle with sexual and asexual phases of development (1). After tissue cysts or oocysts of this parasite are ingested by the definitive (felines) or accidental host (humans), viable tachyzoites are released and subsequently invade epithelial cells by an active

penetration mechanism (2). These tachyzoites develop and multiply inside a parasitophorous vacuole (3). The immune response to *T. gondii* is characterized by a strong and sustained parasite-induced cellular reaction (4). However, parasites reside inside the host in immunoprivileged sites such as the brain and the retina (4, 5). A controlled inflammatory reaction takes place in such organs (6, 7), maintaining the parasite in a slow proliferation mode. In

Received 1 April 2009. Accepted 13 June 2009

immunocompromised hosts, this balance is broken, and reactivation of infection may lead to severe encephalitis (8). Infection during pregnancy can lead to fetal malformation due to severe neurological and ocular manifestations (9, 10) and in Brazil children with congenital retinochoroiditis show evidence of increased risk of multiple recurrences (11).

Studies have demonstrated that *T. gondii* is able to infect murine macrophages (12), monocytes (13) and dendritic cells (DCs) (14) and to use them as Trojan horses to disseminate throughout the host. In studies in which mice were orally inoculated with cysts, parasites were detected in the spleen and Peyer's patches at day 2 and 3 after infection respectively, and in the brain at day 10, with no parasitemia detected (15). Furthermore, dissemination was amplified when infected immature dendritic cells (iDCs) were adoptively transferred to uninfected mice, with diminished expression of the $\beta 2$ integrin chain (16). Infected murine macrophages also express less $\alpha 4$ and $\alpha 5$ integrin and are less adhesive to fibronectin, laminin or collagen (12).

Activation of DCs and Toll-like receptor (TLR) pathways in macrophages leads to increased cell migration and production of pro-inflammatory cytokines that in turn up-regulate co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 (16, 17). *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositol anchors are recognized by TLR2 and TLR4/CD14, and murine macrophages exposed to these molecules produce pro-inflammatory cytokines such as TNF- α (19). Various reports show distinct profiles of CD80/CD86 expression by different cell types upon *T. gondii* infection, while the methodology used to isolate murine or human monocytes/macrophages, to cause infection and to address CD80/CD86 modulation varies (14, 16, 19). In this study, we investigated the expression of co-stimulatory molecules in human and murine macrophage/monocytic lineages infected with *T. gondii* and their ability to migrate in the absence of TLR stimuli.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Parasites were isolated from mouse peritoneal cavity before *in vitro* infection of macrophages, and

parasite load was maintained in Swiss Webster mice following intraperitoneal (i.p.) inoculation. C57BL/6 and CD14^{-/-} mice from the same background were kindly provided by Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) through a collaboration with Dr. Thereza Kipnis, and were bred and maintained at the Animal Facilities of the Laboratório de Biologia do Reconhecer, CBB/UENF. BALB/c mice were bred at UENF's Central Animal Facility. The experimental protocol was approved by UENF's Animal Experimentation Ethics Committee (approval no. # 16/2005).

Cells

Human monocyte lineages (THP1 and freshly isolated) – Cells from human monocytic lineage THP1 were cultured in 75-cm³ culture flasks at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM-F12 media supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Monocytes were isolated from 11 healthy donors from Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil, as follows. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood by centrifugation over a Ficoll-Hypaque gradient for 35 min at room temperature, at 400 g. PBMCs were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS)/citrate (1.49 mM Na₂H₂PO₄; 9.15 mM Na₂HPO₄; 139.97 mM NaCl, 13 mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O; pH 7.2, 100 g, 15 min, room temperature). The cell suspension was then layered on top of a 15 ml Percoll gradient [1:1 (v:v) isosmotic Percoll plus PBS/Citrate] and centrifuged as for the Ficoll gradient. Cells were cultivated in polypropylene tubes to avoid adhesion during infection.

Human macrophages – Human macrophages were obtained by cultivating freshly isolated monocytes for 4 days under adherent conditions with low serum (2% FCS). Prior to infection, cells were harvested by scraping, viability was measured and infection proceeded as described above, in non-adherent conditions.

Peritoneal mouse macrophages – Peritoneal mouse macrophages were obtained from a peritoneal wash of BALB/c mice inoculated with 5 ml of cold PBS, and macrophages were incubated in 24-well culture plates for 30 min under culture conditions (5 × 10⁴ cells per well). After this, non-adherent cells were removed by PBS washing, and the remaining adherent cells (2 × 10⁴ cells per well) were harvested mechanically. Cells were cultured and infected in non-adherent polypropylene tubes.

Bone marrow-derived mouse macrophage – Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained by flushing mouse femurs and were

differentiated in 75 cm³ flasks for 7–10 days in DMEM supplemented with 20% L929 cell conditioned medium, 10% FCS, and 0.5% penicillin-streptomycin.

In vitro *T. gondii* infection – *Toxoplasma gondii* from RH strain tachyzoites were harvested by peritoneal wash and adjusted to obtain five parasites to one cell (for all cells used) as the standard multiplicity of infection (MOI). The viability of cells was evaluated using the Trypan blue (0.4%) exclusion test, after 12, 24 or 48 h of infection.

Flow cytometry – After 12, 24 or 48 h of *T. gondii* infection, cells were washed twice with PBS containing 3% FCS and labeled for 60 min at 4 °C in the dark with monoclonal antibodies against CD80, CD86, CD1a, CD40, CD83, CD11a, CD18 or CD62L coupled with phycoerythrin (R-PE) or fluorescein (FITC) (BD Biosciences, San José, CA, USA or Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Appropriate isotypes (mouse, hamster or rat coupled to R-PE or FITC) were used as controls. After labeling, cells were washed three times (400 g, 4 °C, 5 min) with PBS 3% FCS and analyzed using flow cytometry (ELITE-ESP; Coulter Inc., Fullerton, CA, USA or in FACScalibur, BD). Uninfected cells were used as controls, and 10 000–15 000 events were collected and analyzed. Histograms were obtained using WINMDI 2.8 software.

In vitro adhesion assay – The BMDM were harvested and infected at 5:1 MOI for 1 h. Free parasites were removed by Percoll gradient and cells with associated/internalized parasites were cultivated in 24-well plates for 24 or 48 h. The supernatant was monitored for de-adhered cells and viability was assessed using Trypan blue. After the indicated time points, crystal violet (C₂₅H₃₀ClN₃) 0.05% was added for 10 min and cells were disrupted with 1% SDS overnight. Absorbance was read at 540 nm.

In vitro migration assays – The BMDM were infected as described, submitted to a Percoll gradient and transferred to transwell filters (8 µm pore; Greiner, Frickenhansen, Germany). After 24 or 48 h, transwell filters were removed, and the internal face was swabbed and washed. Filters were stained with Diff-Quik and transmigrated cells counted. Companion plates were stained as described for the adhesion assay in order to count the number of cells that reached the bottom of the plate.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SD, and the Kruskal–Wallis test was used for multiple comparisons, using the GRAPHPAD INSTAT Software.

RESULTS

Human monocytes that were freshly isolated from 11 healthy individuals were infected with *T. gondii* and the expression of co-stimulatory molecules was evaluated 24 h later. At that time point, infection with MOI 5:1 left 80% of viable cells in culture (data not shown). Expression of CD86, CD83, CD1a and HLA-DR was similar to that observed in uninfected control cells (Fig. 1A, B), whereas CD14 expression diminished. Expression of CD80 increased after infection in 4 of 11 donors. Human macrophages infected with *T. gondii* also displayed an increase in CD80, but not in CD86, CD83 or CD1a expression (Fig. 2). Analysis of expression at earlier time points showed that THP1 cells were less refractory, presenting an increase in CD80 and CD1a (Fig. 3)-positive cells.

Expression of adhesion molecules that are known to participate in the cell–cell interaction during migration through the host's barriers and antigen presentation was also analyzed. L-selectin and αL-integrin showed expression profiles similar to those observed in uninfected monocytes (Fig. 4A). Beta2 integrin chain expression also remained unaltered in THP1-infected cells during the time course of infection (Fig. 4B). Analysis of L-selectin and β2 expression in freshly isolated peritoneal macrophages showed that the former did not change significantly, whereas the latter suffered an initial down-regulation but returned to uninfected control levels after 48 h of infection (Fig. 4C).

We assessed the ability of CD14 knockout mouse macrophages to migrate, as an indicator of induction of a pro-inflammatory profile in those macrophages. Cells from CD14KO mice were more sensitive to de-adhesion induced by infection compared to those from wild type mice, de-adhering early, after 24 h of infection (Fig. 5A). However, these cells did not show any increase in mobility according to the transmigration assay (Fig. 5B, C). Similar results were obtained with BMDM from TLR2 knockout mice infected with *T. gondii* (data not shown).

DISCUSSION

Toxoplasma gondii infection causes modulation of the expression of surface molecules of

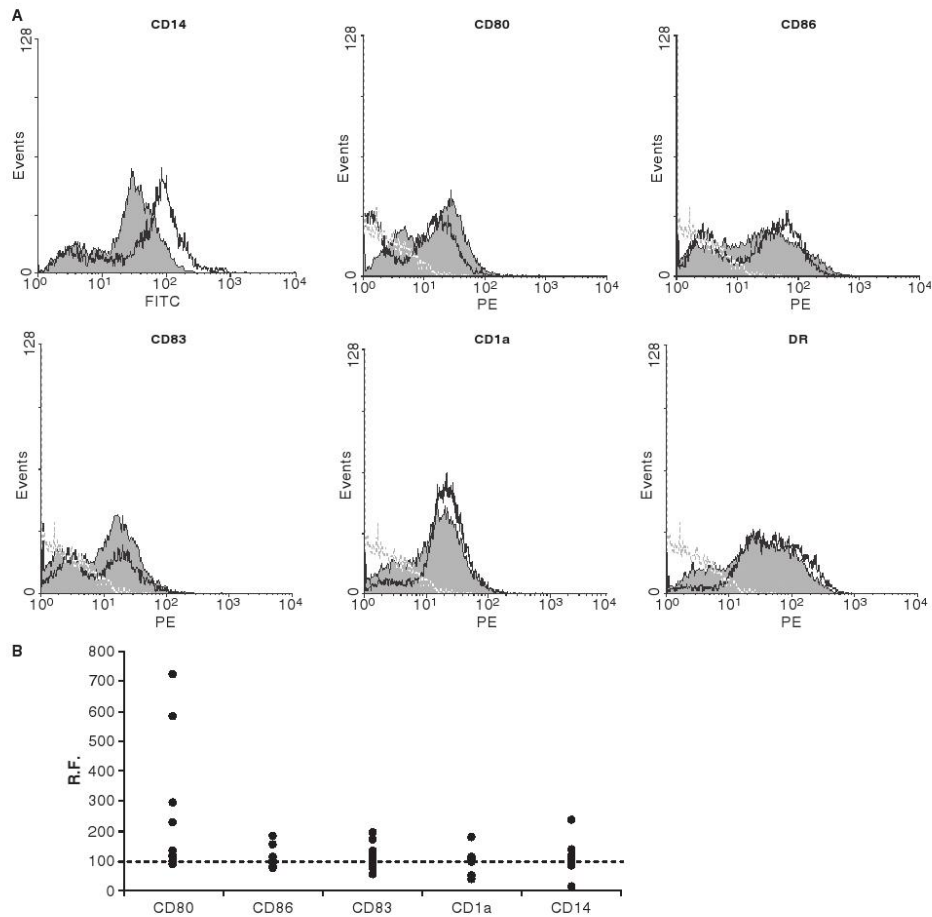


Fig. 1. Expression of co-stimulatory molecules by human monocytes. Monocytes were obtained as described and infection performed at 5:1 MOI. After 24 h of infection cells were stained for cell surface expression of CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a and HLA-DR, and analyzed with flow cytometry (15 000 events counted). One representative experiment is depicted. (A) Fluorescence histograms of infected (filled) or uninfected cells (unfilled). The isotype control is shown as a gray unfilled histogram. (B) The relative fluorescence intensity of markers (10–13 donors) (numerical value of mean fluorescence intensity of each experimental condition divided by the numerical value of its control, multiplied by 100).

leukocytes, possibly via cytokines/chemokines present in the inflammatory environment or by direct down-regulation of infected antigen-presenting cells (6, 12, 14). The parasite is also able to modulate surface molecules on the macrophage, such as major histocompatibility

complex (MHC) class I and II, during the course of infection (6). The present study indicates that unprimed human or murine cells from a macrophage/monocytic lineage infected with *T. gondii* were unable to up-regulate the main co-stimulatory molecules. Expression of CD86, CD83,

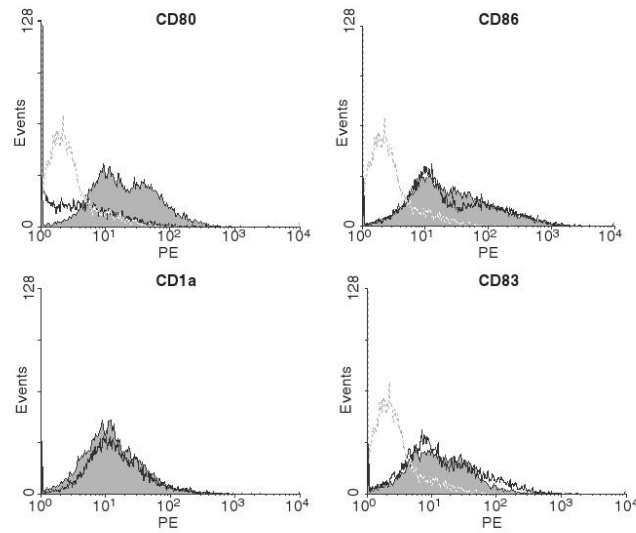


Fig. 2. Expression of co-stimulatory molecules by human macrophages. Macrophages were obtained as described and infection performed at 5:1 MOI. After 24 h of infection cells were stained for expression of CD80, CD86, CD83 and CD1a, and analyzed with flow cytometry (15 000 events counted). Fluorescence histograms of infected cells (filled), uninfected cells (unfilled), or isotype control (gray unfilled) from three representative independent experiments with similar results.

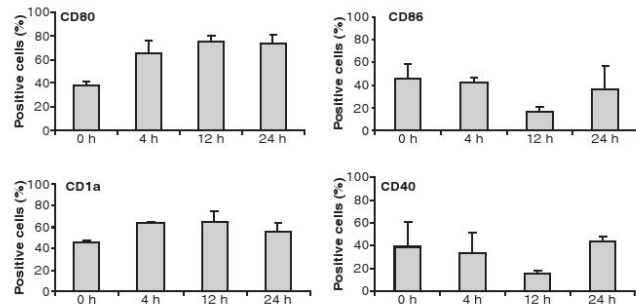


Fig. 3. Expression of co-stimulatory molecules by THP1 cells. Cells were infected at 5:1 MOI, stained as described for expression of CD80, CD86, CD1a and CD40, and analyzed with flow cytometry (15 000 events counted). The results are represented as the percentage of cells positive for the marker indicated (mean \pm SD of three different experiments).

CD1a and HLA-DR remained unchanged in freshly isolated monocytes after 24 h of infection in the absence of any additional stimulus. Monocytes cultured in non-adherent conditions displayed an intermediate phenotype, expressing

CD14 as well as CD83 and CD1a. In fact, non-dendritic CD83⁺CD14⁺ cells have been observed in PBMC or monocytes treated with IFN- α for 24 h (21). Interestingly, these cells maintain their phagocytic activity and do not

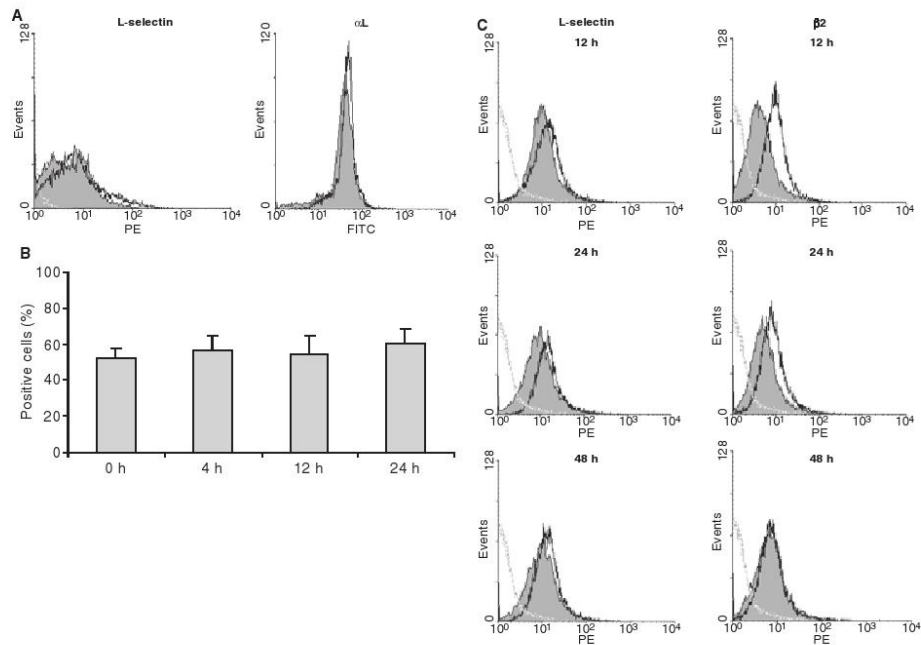


Fig. 4. Expression of adhesion molecules by human and murine monocytes and macrophages. Cells obtained as described and infected at 5:1 MOI were stained for L-selectin, β 2 or α L integrin. (A) Human monocytes stained after 24 h of infection. (B) THP1 cells were stained for β 2 integrin after 0 (uninfected cells), 4, 12 or 24 h of infection. (C) Murine peritoneal macrophages stained after 12, 24 or 48 h for expression of L-selectin or β 2 integrin. Flow cytometric histograms of infected (filled), uninfected cells (unfilled) or isotype control (gray unfilled), representing three independent experiments with similar results are shown in (A) and (C). In (B) results are represented as the percentage of positive cells (mean \pm SD of three different experiments).

acquire the dendritic morphology and are weak inducers of proliferation of naive T cells (21). Infection of immature murine DCs with *T. gondii* leads to increased expression of CD80, CD86, CD83 and MHC class II molecules (14). However, infection of human monocytes with *Leishmania amazonensis* during the first stages of DC differentiation leads to a decrease in CD1a and CD80 expression with no alteration in the expression of HLA-DR (22). Similar results were observed in human monocytes and macrophages infected with *L. chagasi* (23). Moreover, the infection did not impair the terminal differentiation of already committed monocyte-derived DCs (23). These results support the idea that different environments affect cells from the monocytic/macrophage/DC lineage (24) and that different outcomes are expected in response

to parasitic infections. Furthermore, macrophages from congenic strains display differences in CD86 expression following *T. gondii* infection. Thus, macrophages from BALB/c mice show up-regulation of CD86 whereas macrophages from BALB/B exhibit down-regulation of CD86. The expression of CD80 remains the same in both (25). These results also show the influence of host genetic background on the regulation of co-stimulatory molecules, as observed here for the expression of CD80. The results presented here reflect the ability of *T. gondii*-infected cells to modify the expression of co-stimulatory molecules in the absence of an exogenous co-stimulatory stimulus. Induction of CD80 and increased expression of CD86 was observed in PBMC or isolated monocytes upon infection with UV-treated *T. gondii* (19).

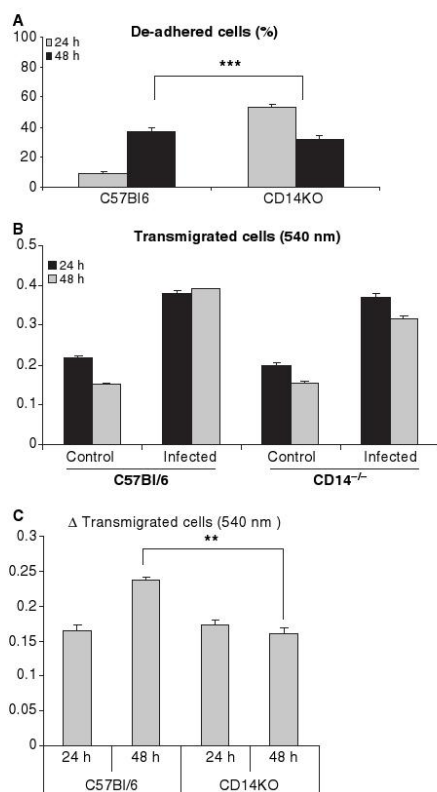


Fig. 5. Adhesion and migration of CD14^{-/-} cells. For the adhesion assay BMDM were infected (MOI 5) and seeded in 24-well plates after removal of free parasites. In (A) viable de-adhered cells were measured at cell supernatant; in (B) the BMDM migrated cells were evaluated as for the adhesion assay after 24 or 48 h of infection. In (C) results are shown as Δ of transmigration results, where the uninfected control value was subtracted from the infected value at the same time point, (median $n = 3$).

However, it has been shown that irradiated parasites are able to invade the host cell but do not divide (20).

The dissemination of *T. gondii* to deeper tissues is a fairly rapid event. In studies in which mice were orally inoculated with cysts, parasites were detected in the spleen and Peyer's patches at day 2 and 3, respectively, and in the brain at day 10, with no parasitemia (26). Furthermore,

dissemination was scaled up when infected iDCs were adoptively transferred to uninfected mice, and diminished expression of the $\beta 2$ integrin chain was shown (27). Migration and recirculation are multistep phenomena involving lymph node chains that collect tissue leukocytes, which later return to circulate in the bloodstream, after accumulation in the thoracic duct. Cells must transmigrate across high endothelial venules, where selectins, integrins and cell adhesion molecules (CAMs) are the molecular regulators of these events (for reviews, see 28–30). Several factors influence the efficiency of cell–cell interactions, including the density of adhesion receptors and the kinetics of association/dissociation amongst adhesion molecules. We thus evaluated the expression of L-selectin, which mediates the rolling process, and $\beta 2$ integrin, which mediates transmigration across the blood vessel endothelia of infected sites or lymph nodes. We demonstrated that expression of L-selectin is not altered in monocytes, THP1 cells or peritoneal murine macrophages. On the other hand, expression of $\beta 2$ integrin decreases after 12 h of infection of murine macrophages but remains unaltered in THP1 cells. Following the initial decrease in $\beta 2$, expression returned to control levels after 48 h of infection. It was recently demonstrated by *in vivo* imaging that the recirculation of monocytes in mice with autoimmune uveoretinitis was L-selectin dependent and cells that were able to cross the retinal barrier were CD62L⁺CCR2⁺CD14⁺ (30). Furthermore, LPS stimulation in monocytes increased the adhesion to ICAM-1 *in vitro* without altering the expression of $\beta 2$ (30).

Adhesion assays using macrophages derived from CD14^{-/-} or TLR2^{-/-} mice showed that such cells were more likely to de-adhere upon infection than cells from wild type mice. Nevertheless, macrophages derived from wild type mice were more successful at transmigrating without any additional stimuli in transwell systems. Bone marrow-derived monocytes, transferred intravenously to mice with established ocular inflammation, required 24–48 h of *in vivo* conditioning before being able to roll on the endothelium efficiently and migrate into the inflamed retina (31). Further experiments must be performed in order to determine the profile of *in vivo* migrating cells infected with *T. gondii*, as the kinetics and order of events might be

influenced by the microenvironment. In addition, the non-stimulatory profile of infected monocytes and macrophages must be confirmed, and *in vivo* imaging analysis of migrating cells should indicate possible differences in migration kinetics vs pattern recognition receptors (PRR) cooperation.

We thank Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) for the CD14 knockout mice. We also thank Rita Mothé Escocard and Fernando Cesar Lopes for technical assistance. We especially thank Thereza Liberman Kipnis (in Memoriam) for her support as head of the LBR over the last 13 years. This work was supported by grants from CNPq 479379/04-1 and 4755744/2001-2, and FAPERJ E-26 170.021/2005. Daniele Seipel da Silva and Flávia Lima Ribeiro-Gomes were the recipients of a graduate fellowship from CAPES.

REFERENCES

- Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
- Morisaki JH, Henser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci* 1995;108:2457–64.
- De Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:162–70.
- Gazzinelli RT, Denkers EY, Sher A. Host resistance to *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol* 1993;93:23–32.
- Hunter CA, Remington JS. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 1994;170:1057–67.
- Lüder CG, Lang T, Beuerle B, Gross U. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 1998;112:308–16.
- Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK. Human microglial defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J Immunol* 1994;152:1246–52.
- Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;14:211–22.
- Richards FO Jr, Kovacs JA, Luft BJ. Preventing toxoplasmic encephalitis in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995;21:S49–56.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008;47:554–66.
- Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M, et al. (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e277.
- Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães U Jr, Arnholdt ACV. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and *in vivo* migration of murine macrophages infected with *T. gondii*. *Microbes Infect* 2004;6:1287–96.
- Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gatel D, Tardieux I. CD11c and CD11b expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 2006;107:309–16.
- Lambert H, Hitzinger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol* 2006;8:1611–23.
- Denkers E, Gazzinelli RT. Regulation and function of T cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol* 1998;11:569–88.
- Dowling D, Hamilton CM, O'Neill SM. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine* 2008;41:254–62.
- Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M, Fabry Z. Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases. *J Immunol* 2007;178:520–9.
- Debierre-Grockiego F, Molitor N, Schwarz RT, Lüder CG. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols up-regulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine macrophages. *Innate Immun* 2009;15:25–32.
- Subauste CS, Waal Malefyt R, Fuh F. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 1998;160:1831–40.
- Hiramoto RM, Galisteo AJ Jr, Nascimento N, Andrade HF Jr. 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine* 2002;20:2072–8.
- Gerlini G, Mariotti G, Chiarugi A, Di Gennaro P, Caporale R, Parenti A, et al. Induction of CD83⁺CD14⁺ nondendritic antigen-presenting-cells by exposure of monocytes to IFN α . *J Immunol* 2008;181:2999–3008.

22. Favali C, Tavares N, Clarêncio J, Barral A, Barral-Netto, Brodskyn C. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leuk Biol* 2007;82:1401–6.
23. De Almeida MC, Cardoso AS, Barral-Netto M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 2003;33:153–62.
24. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008;181:5829–35.
25. Fischer HG, Dörfler R, Bartholomäus S, Harding U. Differential CD86/B7-2 expression and cytokine secretion induced by *Toxoplasma gondii* in macrophages from resistant or susceptible BALB H-2 congenic mice. *Int Immunol* 1999;11:341–9.
26. Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of a virulent strain. *J Parasitol* 1995;81:327–99.
27. Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol* 2006;8:1611–23.
28. Damsky CH, Ilic D. Integrin signaling: it's where the action is. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:594–602.
29. Nourshagh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 2005;26:157–65.
30. Xu H, Manivannan A, Crane I, Dawson R, Liversidge J. Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocytes trafficking in vivo during inflammation. *Blood* 2008;112:1166–74.
31. Bradfield PF, Johnson-Léger CA, Zimmerli C, Imhof BA. LPS differentially regulates adhesion and transendothelial migration of human monocytes under static and flow conditions. *Int Immunol* 2007;20:247–57.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Toxoplasma gondii infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and α v β 3 integrin

Daniele Seipel, Bruno Cabral de Lima Oliveira, Thatiane Lacerda Resende, Sara Hellen Santos Schuindt, Pollyana M. de Oliveira Pimentel, Milton M. Kanashiro, Andrea Cristina Vetö Arnholdt*

Laboratório de Biologia do Reconhecer, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego 2000, LBR 210/P4, Horto, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, CEP 28015-620, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2009
Received in revised form 18 December 2009
Accepted 30 December 2009

Keywords:

Toxoplasma gondii
MT1-MMP
ADAM10
MMP9
CD44
 α v β 3 integrin

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a world wide spread zoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite that is able to disseminate into deep tissues and cross biological barriers, reaching immunoprivileged sites such as the brain and retina. The parasite is able to infect macrophages and dendritic cells for dispersal throughout the body. However, the molecular principals or outcomes of the subversion of the host cell are largely unknown. We evaluated the involvement of host invasive machinery in the migration of *T. gondii* infected murine cells from a monocytic/macrophage lineage. Migration in Matrigel™ of infected macrophages was augmented after 48 h of infection, and inhibition of metalloproteinases abolished migration. We also demonstrated that *T. gondii* infection induces a decreasing of CD44 at cell surface independent of the ERK signaling pathway, and that secretion of active MMP9 is augmented upon infection. Infected macrophages showed increased expression of MT1-MMP and ADAM10 membrane matrix metalloproteinases. Furthermore, processing of pro- α v and pro- β 3 in *T. gondii* infected cells seems to depend on metalloproteinases to generate functional mature integrin α v β 3 molecules, with no evidence of the involvement of proprotein convertase pathway.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasmosis is caused by the obligate intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, which presents a complex life cycle with sexual and asexual phases of development (Weiss and Dubey, 2009). After tissue cysts or oocysts of this parasite are ingested by the definitive (felines) or accidental host (humans), viable bradyzoites or sporozoites are released and invade epithelial cells by an active penetration mechanism, and subsequently develop and multiply inside a parasitophorous vacuole. The immune response to *T. gondii* is characterized by a

strong and sustained parasite-induced cellular reaction (Gazzinelli et al., 1993). However, parasites reside inside the host in immunoprivileged sites such as the brain and the retina (Gazzinelli et al., 1993; Hunter and Remington, 1994). A controlled inflammatory reaction takes place in such organs (Chao et al., 1994), maintaining the parasite in a slow proliferation mode. In immunocompromised hosts, this balance is broken, and reactivation of infection may lead to severe encephalitis (Luft and Remington, 1992). Infection during pregnancy can lead to fetal malformation due to severe neurological and ocular manifestations (Montoya and Remington, 2008) and in Brazil children with congenital retinochoroiditis show evidence of increased risk of multiple recurrences (Gilbert et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +55 2227397127; fax: +55 2227937030.
E-mail address: arnholdt@uenf.br (A.C.V. Arnholdt).

In order to disseminate to deep tissues and reach such sites, *T. gondii* must be able to cross several barriers such as the blood–brain and the placental barrier. In studies in which mice were orally inoculated with cysts, parasites were detected in the spleen and Peyer's patches at days 2 and 3 after infection respectively, and in the brain at day 10, with no parasitemia detected (Sumyuen et al., 1995). Different studies have demonstrated that *T. gondii* is able to infect murine macrophages (Da Gama et al., 2004), monocytes (Courret et al., 2006) and dendritic cells (DCs) (Lambert et al., 2006) and to use them as "Trojan horses" to disseminate throughout the host. Infected murine macrophages express less alpha4 and alpha5 integrin and are less adhesive to fibronectin, laminin or collagen early in infection (Da Gama et al., 2004), and adoptively transferred infected immature DCs show diminished expression of beta2 integrin (Lambert et al., 2006).

Integrins are alpha/beta heterodimers that are vital to many specific cellular interactions, especially in leukocyte para- and transmigration. Migration is a multistep process, involving metalloproteinases that are able to degrade extracellular matrix components (ECM), to promote cross activation of pro-MMPs and to process several cell surface-associated molecules including integrins and CD44 (Itoh and Seiki, 2004; Stefanidakis and Koivunen, 2006). MT1-MMP (Baciu et al., 2003) and ADAM10 (White, 2003) are involved in cell–cell and cell–matrix interactions and CD44 shedding (Kajita et al., 2001; Anderegg et al., 2008). CD44 is a hyaluronan and osteopontin receptor and actin polymerization modulates its surface expression and its availability for MMP9 docking. Shedding of CD44 initiates ECM degradation through MMP9 (Samanna et al., 2007). These molecules form complexes at the cell surface in raft domains (Cayrol et al., 2008), and in cancer cells they are up-regulated and form the invasive machinery, also known as migratory molecular complex or degradome. Complementary to matrix degradation, in cancer cells MMPs convert pro- α v to mature α v subunit of α v β 3 integrin (Baciu et al., 2003). This conversion is usually performed by furin or proprotein convertases (Bassi et al., 2005).

Here, we evaluate the involvement of host invasive machinery in the migration of *T. gondii* infected macrophages. We demonstrate that *T. gondii* promotes shedding of CD44 independent of the ERK signaling pathway, and that host metalloproteinases are necessary for migration of infected cells through the ECM. We also found that infected macrophages express increased levels of activated ADAM-10 and MT1-MMP metalloproteinases and that secretion of activated MMP9 is augmented upon infection. Furthermore, processing of pro- α v in *T. gondii* infected cells seems to depend on matrix metalloproteinases to generate functional mature integrin α v β 3 molecules, with no evidence of proprotein convertase pathway usage.

2. Material and methods

2.1. Animals

Swiss Webster mice that were bred and maintained at UENF's Central Animal Facility were inoculated with *T. gondii* (RH strain) via intra peritoneal injection. In some

experiments RH-GFPS65T (Gubbels et al., 2003) were used. Parasites were later isolated from mouse peritoneal cavity before in vitro infection of macrophages. The experimental protocol was approved by UENF's Animal Experimentation Ethics Committee (approval # 16/2005).

2.2. Cells

Murine macrophages from cell lineage Raw 264.7 were used in several experiments. Following infection, cells were cultivated in polypropylene tubes at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere in DMEM-F12-supplemented media for analysis of surface molecules by flow cytometry or invasion assays.

2.3. In vitro *T. gondii* infection

Tachyzoites were adjusted to obtain 5:1 parasites:cell for all experiments. The viability of cells was evaluated by the Trypan blue (0.2%) exclusion test, after 24 or 48 h of infection. Inhibitors of ERK phosphorylation (u0126) or MMP activity (MMP inhibitor I) (Calbiochem) were used in some experiments at 1 or 10 μ M and 15 or 150 μ M, respectively. Inhibitors were added after infection and maintained in culture.

2.4. Flow cytometry

After 24 or 48 h of *T. gondii* infection, cells were washed twice with PBS containing 1% BSA and labeled for 60 min at 4 °C in the dark with mAbs against CD44 coupled to biotin (Southern Biotech), or pAbs against ADAM-10 (A-20), MT1-MMP (V-16), α v or β 3 (Santa Cruz Biotechnology). Cells were washed (400 g, 4 °C, 5 min) with PBS 1% BSA and incubated with biotinylated swine anti-goat (Invitrogen) for 45 min. After removal of conjugated excess and washing, streptavidin PE (Sigma) or streptavidin PECy5.5 (eBioscience) was added for 30 min. After labeling, cells were washed and fixed with 1% formaldehyde and analyzed by flow cytometry (FACScalibur, BD). 10,000–15,000 events were collected. Histograms were obtained using WinMDI 2.8 software.

2.5. In vitro migration assays

Cells were infected at 5:1 parasite:cell ratio for 1 h, free parasites removed by Percoll gradient and 5×10^4 cells with associated/internalized parasites were transferred to transwell filters that were covered with Matrigel™ (BD Biosciences) or left uncovered. After 24 or 48 h, the transwell filters were removed, and the internal face was swabbed and washed. Filters were stained with Diff-Quik and transmigrating cells counted using AxioVision digital imaging (Zeiss). Companion plates were stained as described for the adhesion assay to measure cells that reached the bottom of the plate. The data are expressed as the percent invasion through the Matrigel™ matrix and membrane relative to migration through the control membrane. The invasion index is expressed as the ratio of the percent invasion of infected macrophages versus the percent invasion of uninfected macrophages.

2.6. Immunoprecipitation and zymography

For immunoprecipitation 3×10^7 cells were infected with 5:1 parasite:cell ratio in DMEN containing 1% FCS. After 24 h of infection the culture supernatant was obtained after centrifugation ($400 \times g$) and concentrated by Centriscart (Sartorius-Stedim Biotech, cutoff 20.000 mw) to the same final volume for all treatments. The resulting supernatants were incubated for 18 h at 4 °C with 2 µg of anti-MMP9 pAb C-20 (Santa Cruz Biotech) and mixed with protein G Plus agarose (Calbiochem) for an additional 3 h.

Pellets containing immune complexes were washed with Low RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl₂, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100). For zymography the pellet was suspended in sample buffer without β-ME. Host cell metalloproteinases were resolved in 8% polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin. After electrophoresis, gels were rinsed in 2.5% Triton X-100 in Tris-HCl pH 7.5, at 37 °C. After 48 h of incubation in 2.5% Triton X-100 in Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ at 37 °C, gels were stained with 0.25% of Coomassie blue and areas of gelatinolytic activity were visualized as clear bands.

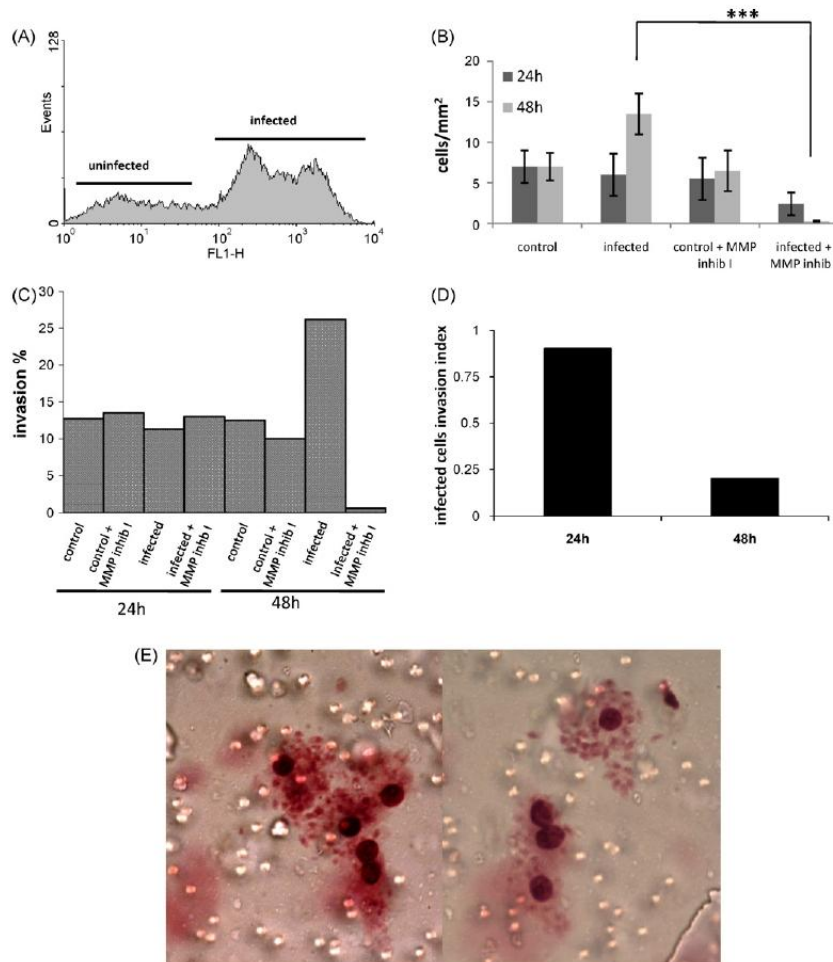


Fig. 1. In vitro migration through basement membrane-like matrix. In (A) macrophages were infected for 1 h with RH-GFPS65T strain and submitted to a Percoll gradient before the migration assay. Flow cytometry analysis showed a fraction enriched with infected cells without free parasites that was used in migration assays. (B) Macrophages were tested regarding their ability to migrate over Matrigel™-covered transwells for 24 or 48 h in presence or absence of MMP I inhibitor. Results expressed as cell number by mm² at the inferior face of Matrigel™ inserts (C) The percentage of invasion and (D) the infected cells invasion index were calculated as recommended by the manufacturer. Results are representative of two experiments performed in duplicate. In (E) a 100× magnification of the migrating cells loaded with tachyzoites.

Please cite this article in press as: Seipel, D., et al., *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. Vet. Parasitol. (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.042

2.7. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.D., and the Kruskal–Wallis or ANOVA test was used for multiple comparisons, using the GraphPad InStat software.

3. Results

3.1. Invasiveness of *T. gondii* infected macrophages over 3D ECM is abolished by inhibition of metalloproteinases

We investigated the invasiveness of infected macrophages over a 3D matrix (Matrigel™) that mimics the basement membrane, and the influence of metalloproteinases expressed/secreted by these cells. To avoid free parasites and maximize the number of infected cells used as input in migration assays, cells were first submitted to a Percoll gradient. Fig. 1A shows that the majority of cells were infected or had parasites firmly adhered to the cell surface. After 24 h of infection few macrophages were able to migrate through transwells covered with Matrigel™ and the presence of MMP inhibitor I did not alter this pattern (Fig. 1B). On the other hand, after 48 h of infection an increase in migrated cells was observed and the presence of MMP inhibitor I drastically decreased the migration. Those observations were corroborated by the % of invasion and invasion index (Fig. 1C and D, respectively). Furthermore, migrating cells were loaded with viable parasites (Fig. 1E). Control uninfected cells did not migrate significantly and no alteration of migration pattern was observed after 24 or 48 h of culture or in presence of MMP inhibitor I.

3.2. *T. gondii* infection increases secretion of active MMP9 and shedding of CD44 by murine macrophages

Culture supernatants of infected macrophages were tested for the presence of active MMP9. After infection supernatants were immunoprecipitated with anti-MMP9

and tested in zymogram gels. Secretion of MMP9 was augmented in infected cells and the active 82 kDa form was observed in zymogram gels (Fig. 2A and B). Bands of 94/92 kDa were also observed, representing SDS and β -ME resisting dimers, along with smaller fragments of 62 kDa that preserved the catalytic domain. Cell surface expression of CD44, a docking molecule for MMP9 during secretion, was evaluated. Infection of macrophages with *T. gondii* resulted in diminished expression of CD44 after 24 h of infection even when cells were pre-stimulated with LPS (Fig. 3). Inhibition of ERK phosphorylation increased expression of CD44 in uninfected and LPS-treated cells (Fig. 3 middle column) and decreased secretion of MMP9 (data not shown). Infected macrophages treated with u0126 did not exhibit increased levels of CD44. Inhibition of MMP activity led to a significant increase in CD44 expression in uninfected or LPS-treated cells. However, addition of MMP inhibitor I in infected cells had no significant effect in the expression of CD44 by infected cells (Fig. 3 right column).

3.3. MT1-MMP and ADAM10 are increased in *T. gondii* infected macrophages

Expression of MT1-MMP on the cell surface of infected macrophages was evaluated. *T. gondii* infected cells with or without previous stimulation with LPS showed an increase in MT1-MMP after 24 h of infection (Fig. 4A). We also examined the expression of ADAM10. *T. gondii* infected macrophages that were previously activated with LPS or not displayed an increase in ADAM10 expression (Fig. 4B).

3.4. Processing of $\alpha v \beta 3$ in *T. gondii* infected macrophages depends on alternative matrix metalloproteinase pathway

Several integrin subunits including $\alpha 4$, $\alpha 5$ and αv reach their mature state after proteolytic cleavage of the respective proprotein precursor by furin/PCs or MT1-MMP pathways. Accordingly, we tested infected cells for

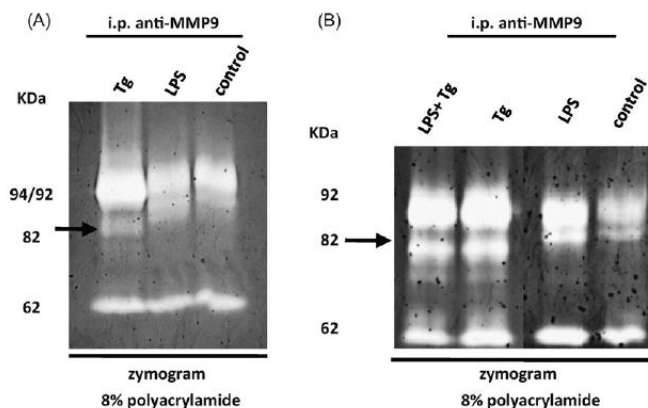


Fig. 2. Secretion of MMP9. In (A) zymography of 24 h and in (B) of 48 h cultured supernatants of macrophages stimulated with LPS previous to infection (LPS + Tg), infected macrophages (Tg), LPS-treated (LPS) or uninfected macrophages (control), immunoprecipitated with anti-MMP9 antibody and applied in 8% polyacrylamide gels with 0.1% gelatin.

Please cite this article in press as: Seipel, D., et al., *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. Vet. Parasitol. (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.042

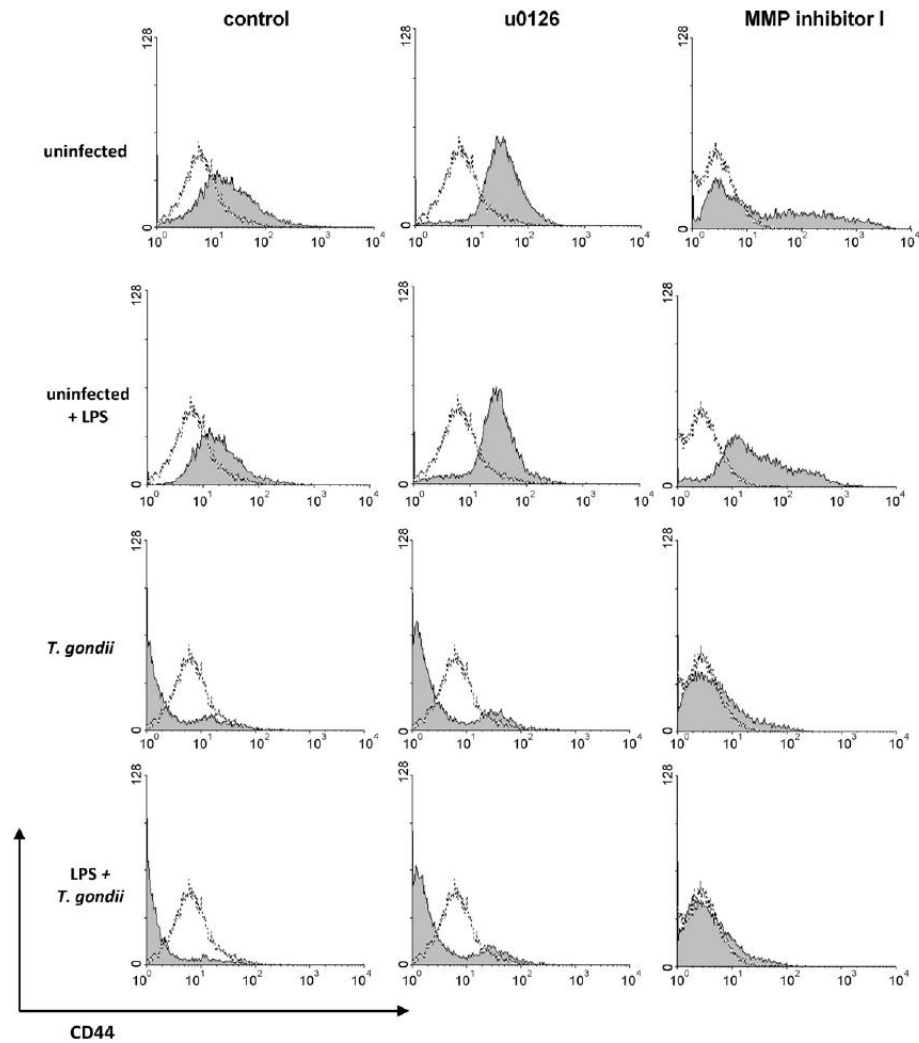


Fig. 3. Expression of CD44. Expression of cell surface CD44, in absence of inhibitors (left column); in presence of ERK phosphorylation inhibitor (u126 10 μ M; middle column); or in presence of MMP inhibitor I (150 μ M; right column). Dotted unfilled histogram represents cells streptavidin PE or PECy5 controls. Ten thousand events were analyzed. Histograms are representative of three experiments with similar results.

the expression of α v and β 3 in the presence of MMP inhibitor I. Expression of α v and β 3 subunits in infected or uninfected cells was similar in the absence of MMP inhibitor I (Fig. 5). However, expression of α v was decreased in infected or LPS-activated cells treated for 24 h with MMP inhibitor I. On the other hand, levels of α v and β 3 in control cells under these conditions increased, suggesting that the processing of pro- α v by PCs was functional only in those cells and that matrix metalloproteinases could be the main pathway for replenishing the cell membrane with mature α v β 3 in *T. gondii* infected macrophages.

4. Discussion

The establishment of toxoplasmosis infection requires that *T. gondii* sporozoites liberated from ingested oocysts penetrate intestinal epithelial cells, where they convert to tachyzoites. This parasite form must be able to cross biological barriers and disseminate to organs either hematogenously or via lymphatics (Hunter and Remington, 1994). The way in which the parasite resides inside permissive leukocytes and reaches immunoprivileged sites by crossing the blood–brain barrier through a facilitated entry mechanism or by direct transmigration is beginning

Please cite this article in press as: Seipel, D., et al., *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. Vet. Parasitol. (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.042

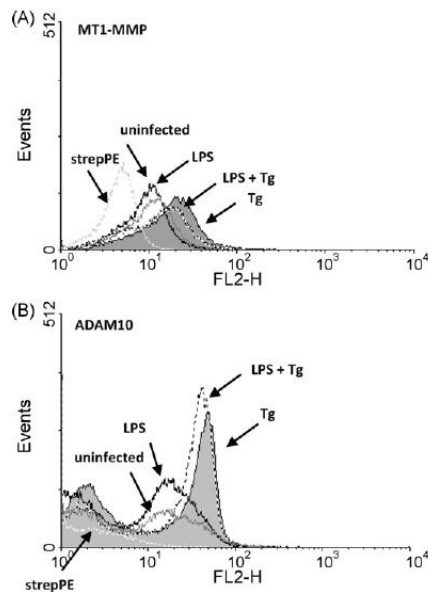


Fig. 4. Membrane metalloproteinase expression by *T. gondii* infected macrophages. In (A) flow cytometric analysis of MT1-MMP expression and in (B) of ADAM10 expression. Gray filled histograms represent infected macrophages, dotted histograms represent cells pre-treated with LPS for 30 min before infection, black unfilled histograms represent cells treated with LPS but not infected and gray unfilled histograms represent uninfected cells. Twenty thousand events were analyzed. Results are representative of three experiments with similar results.

to be understood. Several groups have demonstrated that *T. gondii* is able to infect murine macrophages, monocytes and DCs (Da Gama et al., 2004; Lambert et al., 2006; Courret et al., 2006) and use them as “Trojan horses” to disseminate throughout the host. The regulation of the expression of secreted or membrane matrix metalloproteinases, integrins and other docking molecules is fundamental during this process. One of the roles of MMPs is to clear the path for the migrating cell in tissues or the basement membrane. Inhibition of MMPs in *T. gondii* infected macrophages led to blockage of *in vitro* migration through Matrigel™ after 48 h of infection. We observed that *T. gondii* infection increased secretion of active MMP9 form (Rosenblum et al., 2007; Geurts et al., 2008), a secreted metalloproteinase that is central in the migratory molecular complex, suggesting that this metalloproteinase is fundamental for migration of infected macrophages. Buache et al. (2007) showed that THP1 cells infected with *T. gondii* secrete decreased quantities of proMMP2 and proMMP9. We inserted two additional steps before zymography (concentration of conditioned medium and immunoprecipitation with anti-MMP9) that allowed us to improve the visualization of enzymatic activity. Based on our results, we suggest that the diminished profile the authors observed might be due to increasing quantities of the active form of MMP9, derived from proMMP9.

Secretion of MMP9 requires an intermediary step, through docking at cell surface. CD44 and $\alpha 4\beta 1$ or $\alpha v\beta 3$ integrins form a complex at the cell surface and function as a docking structure to proMMP9 (Redondo-Muñoz et al., 2008). CD44 are class I transmembrane glycoproteins that are involved in cell–cell and cell–matrix interactions, binding to hyaluronan (HA) and osteopontin (OPN) (Rangaswami et al., 2006), and participating in many cellular processes such as growth, survival, differentiation and motility. Evaluation of CD44 expression on the cell surface showed that *T. gondii* infection decreased CD44 expression. The inhibition of MMP activity increased CD44 expression in uninfected cells but infected macrophages continued to lack CD44 expression. Treatment with LPS in the presence of MMP inhibitor I also led to augmented levels of CD44, and subsequent infection with *T. gondii* down-regulated expression of this molecule. Further experiments demonstrate the presence of soluble CD44 (data not shown) suggesting that *T. gondii* promotes shedding of CD44, mediating the secretion of MMP9, as observed in other pathological and physiological conditions (Samanna et al., 2007; Redondo-Muñoz et al., 2008). However, is critical to identify the sheddases that are responsible for this event.

Several matrix metalloproteinases are involved in migration processes and co-localize at the leading edge or at the uropod of migrating cells with different sets of molecules. At the leading edge MT1-MMP1, a transmembrane matrix metalloproteinase, was shown to co-localize with $\alpha v\beta 3$ integrin and uPAR (Stefanidakis and Koivunen, 2006). CD44 is also located at the leading edge of many types of cells, including migrating neutrophils (Alstergren et al., 2004) and osteoclasts (Samanna et al., 2007). MT1-MMP is an important modifier of the pericellular environment, directing migration through degradation of ECM components, especially collagens. But MT1-MMP and ADAM10 are also important in directional migration through the shedding of CD44 (Kajita et al., 2001; Anderegg et al., 2008; Murphy and Nagase, 2008). Our work showed increasing levels of MT1-MMP and ADAM10 at the cell surface of *T. gondii* infected macrophages. It has been reported that the dependence of shedding of CD44 on MT1-MMP involves ERK pathway activation (Takino et al., 2006). Uninfected or LPS stimulated cells treated with MEKK inhibitor, blocking ERK's phosphorylation, exhibited increased CD44 expression at cell surface. Nevertheless, no blockage of CD44 decreasing was observed in *T. gondii* infected cells after u0126 treatment.

Besides their role in modifying the pericellular space, matrix metalloproteinases are mediators of integrin maturation, converting pro- α chains and making them available to interact with β chains. Integrin $\alpha v\beta 3$ is fundamental in crossing the blood–brain barrier and it is also able to regulate the binding of $\alpha 2\beta 1$ to fibronectin and the conversion of pro- αv to the mature αv subunit. This conversion is achieved by MT1-MMP in breast carcinoma cells (Baciu et al., 2003), but is usually performed by proprotein convertases (PCs) (Bassi et al., 2005). Infection of murine macrophages with *T. gondii* did not interfere initially with expression of αv or $\beta 3$ at the cell surface. However, in the presence of MMP inhibitor I, infected cells

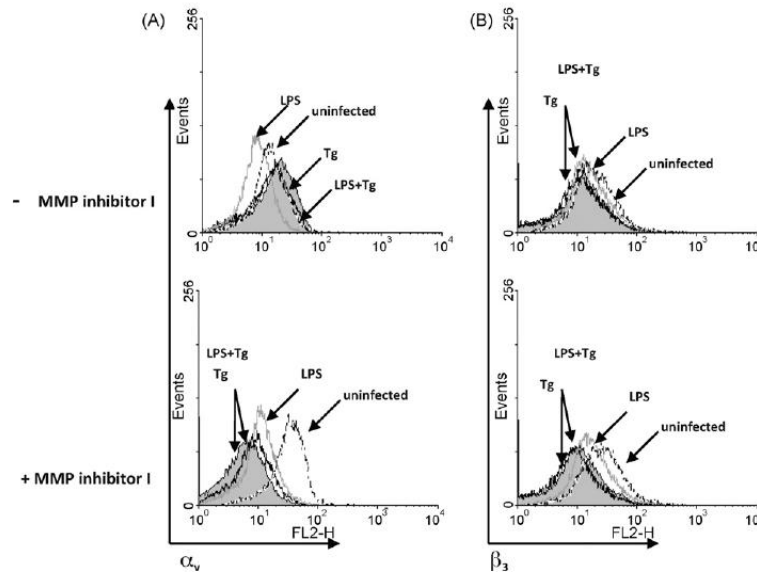


Fig. 5. Expression of αv and $\beta 3$ integrins. Flow cytometry analysis of αv (left panel) and $\beta 3$ (right panel) integrin subunits expression. Gray filled histograms are representative of infected macrophages, black unfilled histograms represent cells pre-treated with LPS for 30 min before infection, gray histograms represent cells treated with LPS but not infected and dotted histograms represent uninfected cells in presence (bottom panel) or absence of MMP inhibitor I (upper panel). Twenty thousand events were analyzed. Results are representative of three experiments with similar results.

failed to express normal levels of αv at the cell surface. On the other hand, uninfected cells exhibited higher levels of αv and $\beta 3$, indicating that the furin/PC pathway was used to mature pro- αv and $\beta 3$ into $\alpha v\beta 3$. The MT1-MMP pathway might be a preferential pathway for processing pro-integrin subunits in *T. gondii* infected macrophages. Furthermore, *T. gondii* metalloproteinases could also play a role in processing pro-integrin subunits. Taken together, the results reported herein suggest that MT1-MMP, ADAM10, CD44, MMP9 and $\alpha v\beta 3$, part of the migratory molecular complex observed in several physiological and pathological mechanisms involving migration, are regulated during *T. gondii* infection and might facilitate the access of infected leukocytes to immunoprivileged sites.

Acknowledgements

We thank Rita Mothé Escocard, Juliana Azevedo Silva Fernando Cesar Lopes, and the UENF's Central Animal Facility technicians for their assistance. We also thank Dr. R.A. DaMatta for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from CNPq 479379/04-1 and 4755744/2001-2, and FAPERJ E-26 170.021/2005. Daniele Seipel da Silva was the recipient of a graduate fellowship from CAPES and currently recipient of PDJ/CNPq.

References

- Alstergren, P., Zhu, B., Glougauer, M., Mak, T.W., Ellen, R.P., Sodek, J., 2004. Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell surface expression of CD44. *Cell. Immunol.* 231, 146–157.
- Andereg, U., Eichenberg, T., Parthau, T., Haiduk, C., Saalbach, C., Milkova, L., Ludwig, A., Grosche, J., Gebhardt, C., Voelcker, V., Sleeman, J.P., Simon, J.C., 2008. ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 112, 263–273.
- Baciu, P.C., Suleiman, E.A., Deryugina, E.L., Strongin, A.Y., 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro- αv integrin regulates cross-talk between $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 291, 167–175.
- Bassi, D.E., Fu, J., Lopez de Cicco, R., Klein-Szanto, A.J., 2005. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog.* 44, 151–161.
- Buache, E., Garnotel, R., Aubert, D., Gillery, P., Villena, I., 2007. Reduced secretion and expression of gelatinase profile in *Toxoplasma gondii*-infected human monocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 298–303.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthllier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D., Prat, A., 2008. Adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily are crucial effectors of leukocyte trafficking into the central NE. *Nat. Immunol.* 9, 137–145.
- Chao, C.C., Gekker, G., Hu, S., Peterson, P.K., 1994. Human microglial defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J. Immunol.* 152, 1246–1252.
- Couret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni, D., Gâtel, D., Tardieux, I., 2006. CD11c and CD11b expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107, 309–316.
- Da Gama, L.M., Ribeiro-Gomes, F.L., Guimarães Jr., U., Arnholdt, A.C.V., 2004. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *T. gondii*. *Microbes Infect.* 6, 1287–1296.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., Sher, A., 1993. Host resistance to *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp. Parasitol.* 93, 23–32.
- Geurts, N., Martens, E., Van Aelst, I., Proost, P., Opendakker, G., Van den Steen, P.E., 2008. Beta-hematin interaction with the hemopexin domain of gelatinase/MMP-9 provokes autocatalytic processing of

Please cite this article in press as: Seipel, D., et al., *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. *Vet. Parasitol.* (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.042

- the propeptide, thereby priming activation by MMP-3. *Biochemistry* 47, 2689–2699.
- Gilbert, R.E., Freeman, K., Lago, E.G., Bahia-Oliveira, L.M., Tan, H.K., Wallon, M., Buffolano, W., Stanford, M.R., Petersen, E., for the EMSCOT, 2008. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e277.
- Gubbels, M.J., Li, C., Striepen, B., 2003. A high throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 309–316.
- Hunter, C.A., Remington, J.S., 1994. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* 170, 1057–1067.
- Itoh, Y., Seiki, M., 2004. MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 6, 285–289.
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., Seiki, M., 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J. Cell Biol.* 153, 893–904.
- Lambert, H., Hitzinger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., Barragan, A., 2006. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol.* 8, 1611–1623.
- Luft, B.J., Remington, J.S., 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 14, 211–222.
- Montoya, J.G., Remington, J.S., 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 47, 554–566.
- Murphy, G., Nagase, H., 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* 29, 290–308.
- Rangaswami, H., Bulbule, A., Kundu, G.C., 2006. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 16, 79–87.
- Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., Garcia-Marco, J.A., del Cerro, M.H., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Terol, M.J., Garcia-Pardo, A., 2008. $\alpha 4\beta 1$ integrin 190kDa CD44 v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP9 in chronic leukemic but not in normal B cell. *Blood* 112, 169–178.
- Rosenblum, G., Van den Steen, P.E., Cohen, S.R., Grossmann, J.G., Frenkel, J., Sertchook, R., Slack, N., Strange, R.W., Opdenakker, G., Sagi, I., 2007. Insights into the structure and domain flexibility of full-length pro-matrix metalloproteinase-9/gelatinase B. *Structure* 15, 1227–1236.
- Samanna, V., Ma, T., Mak, T.A., Rogers, M., Chellaiah, M.A., 2007. Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP9 activation and osteoclast function. *J. Cell Physiol.* 213, 710–720.
- Stefanidakis, M., Koivunen, E., 2006. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* 108, 1441–1450.
- Sumyuen, M.H., Garin, Y.J., Derouin, F., 1995. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of a virulent strain. *J. Parasitol.* 81, 327–399.
- Takino, T., Watanabe, Y., Matsui, M., Miyamori, H., Kudo, T., Seiki, M., Sato, H., 2006. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp. Cell Res.* 312, 1381–1389.
- White, J.M., 2003. ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. *Cur. Opin. Cell Biol.* 15, 598–606.
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39, 895–901.

Please cite this article in press as: Seipel, D., et al., *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and $\alpha 4\beta 3$ integrin. *Vet. Parasitol.* (2010), doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.042

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](#)