UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Ativação de macrófagos por proteínas de
micronema de *Toxoplasma gondii* é mediada
pela interação com receptores do tipo *Toll***

ALINE SARDINHA DA SILVA

Ribeirão Preto

2012

ALINE SARDINHA DA SILVA

Ativação de macrófagos por proteínas de micronema de *Toxoplasma gondii* é mediada pela interação com receptores do tipo *Toll*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sardinha-Silva, Aline

Ativação de macrófagos por proteínas de micronema de *Toxoplasma gondii* é mediada pela interação com receptores do tipo *Toll*

Ribeirão Preto, 2012.

89p. 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP
– Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

1. *Toxoplasma gondii* 2. Macrófagos 3. Micronema 4. Proteína recombinante 5.
Receptores *Toll-like* 2 e 4

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Sardinha da Silva

Ativação de macrófagos por proteínas de micronemas de *Toxoplasma gondii* é mediada pela interação com receptores do tipo *Toll*.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Imunologia – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Apoio Financeiro: CNPq e FAPESP

Dedico este trabalho aos meus pais, Adilson e Valdete, pelo amor, dedicação e apoio incondicionais. Dedico também aos demais presentes que Deus colocou em minha vida. Às minhas irmãs Miriam e Daniela, e aos meus avós Angelina e Elidio (em memória).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre presente na minha vida e me deu, além da oportunidade de alcançar meus objetivos, força para enfrentar cada dificuldade.

À querida Professora Dra. Maria Cristina Roque Barreira pela acolhedora recepção em seu laboratório, pelas constantes lições de responsabilidade, ensinamentos, dedicação e pelo carinho com que sempre me atendeu. Obrigada pela confiança em meu trabalho.

Ao Professor Dr. Ademilson Panunto Castelo, conterrâneo bauruense, pelo pronto auxílio com questões burocráticas.

À Dra. Camila Figueiredo Pinzan (Camilinha), pelo seu tempo disponibilizado, seu apoio e sua dedicação. Suas sugestões e nossas discussões foram essenciais para que a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata, ao Professor Dr. Dario Simões Zamboni e a colega de pós-graduação Larissa Dias Cunha, pelos ensinamentos com a técnica de PCR, por todo o auxílio e amparo a mim concedido sempre que precisei tirar alguma dúvida.

Ao Laboratório de Micologia Molecular, ao Professor Dr. Paulo Coelho, a colega de pós-graduação Ms. Mariana Aprigio Assis (Mari) e a Carol por todo o auxílio com os inúmeros géis de PCR.

Ao bioterista Marcos, biotério da Neuro, pela ajuda com a geração e criação dos animais duplo nocautes. Graças ao seu trabalho e dedicação, o sucesso desse objetivo foi alcançado.

À Sandra, Patrícia, Inês e Tati, pela dedicação ao vosso trabalho técnico e ao grupo em geral, vocês organizam e facilitam a funcionalidade do laboratório.

Aos bioteristas Sr. Domingos, Júlio, Rinaldo e Cristina pela boa disposição em fornecer e ajudar na manutenção dos animais.

À Érica, pelo auxílio com as questões burocráticas, sempre pronta a nos ajudar.

À Ana Cristine, que sempre esteve disposta a ouvir minhas dúvidas e solucionar meus problemas. Obrigada pela preocupação comigo com respeito às datas, assuntos burocráticos e documentos, pelas agradáveis conversas e momentos de descontração.

A todos os colegas de pós-graduação do programa Imunologia Básica e Aplicada pela agradável convivência, principalmente à Patrícia Assis, companheira de ap.

Aos amigos do lab de Imunoquímica e Glicobiologia Nerry (mamãe), Marina (Má), Fausto Bruno (Faustinho) e André (Xexela), obrigada pela amizade, pela agradável convivência, pelos inúmeros momentos de descontração (tereré) e auxílios com dúvidas e experimentos... obrigada por fazerem parte da minha jornada e tornarem meus dias aqui em Ribeirão Preto muito mais agradáveis!

Aos colegas Rafael, Thiago, Vânia, Lu Ruas, Aline mãe (rs), Marcel, Aninha, Marise, Carla e Fernanda... pelas ajudas, conversas, dúvidas e risadas...

À minha amiga que conheci em Ribeirão Preto, Fran, obrigada pelo apoio, conversas e risadas...

Aos meus familiares, que apesar da distância sempre se fizeram presentes, se preocupando, me apoiando e torcendo por mim.

Às minhas amigas de Bauru, Carolzinha, Dani, Lilian e Ercy... por deixar com que a distância e a correria do dia-a-dia não atrapalhem nossa amizade... vocês são muito importantes para mim.

Ao meu incrível namorado Diego... obrigada por surgir em minha vida e fazer parte dela, por estar presente em todos os momentos, pelo imenso carinho e amor,

apoio emocional e profissional, pelo incentivo e muitas vezes pelas discussões imunológicas (rs). Te admiro muito, pessoal e profissionalmente! Te amo!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação e para a realização desse trabalho, muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho.

“Se cheguei até aqui foi por estar apoiado sobre o ombro de gigantes”

Isaac Newton

Sumário

Resumo	13
Abstract	16
Lista de Abreviaturas	20
Introdução	24
1. O <i>Toxoplasma gondii</i>	24
1.1. Aspectos gerais	24
1.2. Morfologia	25
2. Proteínas da Superfície de <i>Toxoplasma gondii</i> e seu papel na invasão	26
3. Atividade lectínica do complexo TgMIC1/MIC4/MIC6	29
4. Imunidade ao <i>Toxoplasma gondii</i> e papel dos Toll-like Receptors (TLRs).....	31
Objetivos	38
Objetivo Geral	38
Objetivos Específicos	38
Material e Métodos	40
1. Animais	40
2. Purificação de TgMIC1 e TgMIC4 de corpos de inclusão	40
3. Refolding de TgMIC1 e TgMIC4 pelo método de diálise.....	41
4. Obtenção e cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs).....	41
5. Avaliação da produção de citocinas por macrófagos estimulados com proteínas de micronema de <i>T.gondii</i> por ELISA.....	42
6. Dosagem de óxido nítrico (NO)	43
7. Ensaio da atividade migratória pelo método de <i>wound healing</i>	44
8. Ensaio de atividade fagocítica por microscopia de fluorescência	44
9. Extração de DNA e reação de polimerização em cadeia (PCR) para identificar animais duplo nocautes.....	45
Resultados	48
1. Caracterização das proteínas recombinantes <i>TgMIC1</i> e <i>TgMIC4</i> utilizadas no estudo	48
2. Caracterização dos macrófagos murinos utilizados no estudo	50
3. Proteínas de micronemas de <i>T.gondii</i> induzem a produção de citocinas por macrófagos murinos, de maneira dependente da expressão de TLRs	51

4. Proteínas de micronemas de <i>T.gondii</i> induzem a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos de maneira dependente da expressão de TLRs	54
5. Proteínas de micronemas de <i>T.gondii</i> induzem aumento da motilidade de macrófagos de maneira dependente de TLRs.....	56
6. Proteínas de micronemas de <i>T.gondii</i> induzem a atividade fagocítica de macrófagos de maneira dependente de TLR4.....	62
9. Geração do camundongo duplo nocaute (DKO TLR2 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-})	67
Discussão	73
Conclusões.....	83
Referências Bibliográficas	84

Resumo

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídio intracelular obrigatório conhecido por sua habilidade em parasitar uma ampla gama de espécies hospedeiras. A região apical do parasito é rica em organelas que, em função dos produtos liberados, estão envolvidas no processo de adesão e invasão da célula hospedeira. As proteínas liberadas por micronemas (MICs), solúveis e transmembrana, possuem domínios adesivos essenciais para a virulência do parasita. Algumas dessas proteínas são encontradas associadas entre si na superfície do taquizoíta, formando complexos como *TgMIC1/MIC4/MIC6* e *TgMIC3/MIC8*. Em estudos anteriores demonstramos a que o subcomplexo *TgMIC1/MIC4* (Fração LAC+) liga-se à lactose e estimula macrófagos a secretar IL-12. Verificamos, utilizando células HEK293 transfectadas, que um dos principais mecanismos responsáveis pela produção de IL-12 decorria do reconhecimento de N-glicanos do ectodomínio de TLR2 pelo domínio de reconhecimento de carboidrato de *TgMIC1*. O objetivo do presente estudo foi o de investigar a capacidade de *TgMIC1* e *TgMIC4* de ativar macrófagos murinos e qual o papel desempenhado por TLR2 e/ou TLR4 no desencadeamento dessa ativação. Mostramos que macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57Bl/6, estimulados com *TgMIC1* e *TgMIC4*, utilizadas isoladamente ou em combinação, secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β , produzem altos níveis de óxido nítrico, e têm aumentadas suas capacidades migratória e fagocítica. Os ensaios que utilizaram macrófagos de camundongos C57Bl/6 nocauteados revelaram que a ausência de expressão de TLR2 ou de TLR4 prejudicou os efeitos ativadores exercidos por *TgMIC1* e *TgMIC4*. Macrófagos TLR2^{-/-} tiveram as manifestações de ativação celular significativamente reduzidas em relação aos macrófagos selvagens. Por outro lado, esses efeitos foram mais afetados pela ausência de TLR4, uma vez que as respostas obtidas frente ao estímulo com *TgMIC1*

ou TgMIC4 eram similares às verificadas em células não estimuladas (controle negativo). Concluimos que *TgMIC1* e *TgMIC4* interagem com os receptores do tipo *toll* 2 e 4 expressos por macrófagos, levando à ativação celular manifesta por alta produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, e aumento das capacidades migratória e fagocítica. A interação com TLR4 é preponderante em relação à estabelecida com TLR2 no desencadeamento de ativação celular.

Abstract

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular coccidian protozoan known for its ability to parasitize a wide range of host species. The parasite's apical region is rich in organelles that, because of the products it releases, are involved in the processes of adhesion and invasion of the host cell. The soluble and transmembrane proteins released by the micronemes (MICs), have adhesive domains that are essential for the parasite virulence. Some of these proteins can be found associated with each other on the tachyzoite surface, as it is the case of TgMIC1/MIC4/MIC6 or TgMIC3/TgMIC8 complexes. Our group has demonstrated in previous studies that the TgMIC1/TgMIC4 subcomplex (LAC+ fraction) binds to lactose and stimulates macrophages to release IL-12. Using HEK293 transfected cells, we showed that one of the main mechanisms leading to IL-12 release by macrophages, was the recognition of N-glycans of the TLR2 ectodomain by the carbohydrate recognition domain of TgMIC1. Thus, the objective of this study was to address whether TgMIC1 and TgMIC4 activate murine macrophages and what is the role of TLR2 and TLR4 in macrophage activation. Our results show that the stimulation of C57BL/6 mice bone marrow derived macrophages with TgMIC1 and TgMIC4, alone or in combination, induce the release of high levels of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-12 and IL-1 β , and also nitric oxide; and increases phagocytic activity and cell migration activity. The assays using knockout C57BL/6 macrophages showed that the absence of TLR2 or TLR4 expression impaired the activating effects of TgMIC1 e TgMIC4. TLR2^{-/-} macrophages presented significantly reduced cell activation manifestations compared to WT macrophages. On the other hand, these effects were more affected in the absence of TLR4, once the responses obtained with TgMIC1 or TgMIC4 stimulation were similar to those observed in non stimulated cells (negative control). We conclude that TgMIC1 and TgMIC4 interact with the receptors Toll like 2 and 4 expressed in macrophages, leading to cell

activation, resulting in high cytokine and inflammatory mediators production, and increased migratory and phagocytic capacity. The interaction with TLR4 is predominant over that established with TLR2 in the triggering of cell activation.

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

B6: C57BL/6

BCA: Bicinchoninic acid assay

BMDM: “Bone marrow derived macrophages” – Macrófagos derivados de medula óssea

CRD: Carbohidrato

DAPI: “4’ 6-diamino-2 phenylindol”

DKO: Geneticamente deficiente para os receptores tipo toll 2 e 4

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

EGF: Fator de crescimento semelhante ao epidermal

GAL: “Galactose adherence lectin” – lectina de aderência à galactose

GPI: “Glycophosphatidylinositol” - glicofosfatidilinositol

HEK293: “Human Embryonic Kidney 293 cells” – células embrionárias de rim humano 293

IFN- γ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-12p40: Subunidade p40 da Interleucina 12

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-2: Interleucina 2

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

kDa: Quilodáton

LCCM: “L-cell conditioned media”

LPS: Lipopolissacarídeo

MAR: Repetição adesiva ?

MAR1: Repetição adesiva 1

MAR2: Repetição adesiva 2

- MCP-1:** “Monocyte chemotractant protein 1” – proteína quimioatraente de monócitos 1
- M-CSF:** “Monocyte colony stimulating factor” – fator estimulador de crescimento de colônias de monócitos
- MIC:** Proteínas de micronema
- mRNA:** Ácido ribonucleico RNA mensageiro
- MyD88:** “Myeloid differentiation primary response gene 88”
- NK:** Células “natural killer”
- NKkB:** “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
- NO:** Óxido nítrico
- NT:** Amino terminal
- PAMP:** “Pathogen associated molecular patterns” – padrões moleculares associados a patógenos
- PBS:** “phosphate buffered saline” – solução salina de fosfato tamponada
- PBS-T:** salina de fosfato tamponada com 0,05% de tween 20
- PCR:** “Polymerase chain reaction” – reação em cadeia da polimerase
- PGN:** Proteoglicano
- PHA-L:** Ligante de N-acetil glucosamina
- PRR:** “Pattern recognition receptor” – receptor de reconhecimento de padrões
- RNA:** ácido ribonucleico
- RPM:** Rotações por minuto
- rTgMIC1:** Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 1 recombinante
- rTgMIC4:** Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 4 recombinante
- SBF:** Soro bovino fetal
- SDS:** “Sodium dodecyl sulfate” – dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE:** “Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis” – gel de eletroforese de dodecil sulfato de sódio
- SP-A:** Proteína surfactante A
- STAg:** Antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*
- T. cuniculi:*** *Toxoplasma cuniculi*

T. gondii: *Toxoplasma gondii*

TgMIC1: Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 1

TgMIC1/4: Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 1 e 4

TgMIC3: Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 3

TgMIC4: Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 4

TgMIC6: Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 6

TgMIC8: Proteína de micronema de *Toxoplasma gondii* 8

Th1: T “helper” 1

TLR: “Toll like receptor” – receptor do tipo toll

TLR11: Receptor do tipo toll 11

TLR11^{-/-}: Geneticamente deficiente para o receptor do tipo toll 11

TLR2: Receptor do tipo toll 2

TLR2^{-/-}: Geneticamente deficiente para o receptor do tipo toll 2

TLR2^{+/-}: Parcialmente geneticamente deficiente para o receptor do tipo toll 2

TLR2x4^{-/-}: Geneticamente deficiente para os receptores do tipo toll 2 e 4

TLR4: Receptor do tipo toll 4

TLR4^{-/-}: Geneticamente deficiente para o receptor do tipo toll 4

TLR4^{+/-}: Parcialmente geneticamente deficiente para o receptor do tipo toll 2

TLR5: Receptor do tipo toll 5

TLR9: Receptor do tipo toll 9

TLR9^{-/-}: Geneticamente deficiente para o receptor do tipo toll 9

TMB: Tetrametil benzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

Tregs: Células T reguladoras

WGA: Ligante de N-acetil glucosamina / ácido siálico

WT: “Wild type” – tipo selvagem

Introdução

Introdução

1. O *Toxoplasma gondii*

1.1. Aspectos gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídio intracelular obrigatório conhecido por sua habilidade em parasitar uma ampla gama de espécies hospedeiras. O fato de não se conhecer nenhuma espécie de mamífero ou ave resistente à infecção por esse agente (Dubey, Weigel *et al.*, 1995; Tenter, Heckeroth *et al.*, 2000) contribui para que a toxoplasmose seja considerada como a zoonose mais difundida no mundo (Chowdhury, 1986). Estima-se que um terço da população humana global seja cronicamente infectada pelo parasito (Tenter, Heckeroth *et al.*, 2000); no entanto, a doença clínica é geralmente limitada a indivíduos imunodeprimidos e a formas congênitas, estas resultantes da infecção aguda durante a gestação (Black e Boothroyd, 2000).

A primeira descrição do *T. gondii* foi feita independentemente, em 1908, por Splendore, no Brasil, que observou esses parasitos em coelhos, e na Tunísia, por Nicole & Marceaux, em um roedor norte-africano chamado "gondi" (*Ctenodactylus gondi*). No ano seguinte (1909), Nicole & Marceaux criaram um novo gênero *Toxoplasma*, que incluía a espécie *T. gondii*, por eles descrita e *T. cuniculi*, descrito por Splendore. Constatou-se, posteriormente, que esses protozoários constituíam uma mesma espécie, identificada pela denominação de *Toxoplasma gondii*.

1.2. **Morfologia**

T. gondii, como outros membros do filo Apicomplexa, caracteriza-se por possuir uma região apical especializada, rica em organelas associadas ao processo de invasão da célula hospedeira (Morissette *et al.*, 1994). O *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos — os taquizoítas (do grego *tachys* = rápido; em grupos ou clones), forma que apresenta uma rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na forma aguda da doença; os bradizoítas (do grego *brady* = lento; em cistos teciduais), forma que por estresse imposto pelo sistema imunológico encontra-se dentro de cistos sob replicação lenta; e os esporocistos (em oocistos liberados nas fezes de felídeos), que correspondem às formas infectantes oriundas de processo de reprodução sexuada do parasito que ocorre no intestino de felinos. Nos três estágios, o protozoário apresenta morfologia similar tendo a extremidade anterior afilada e a posterior arredondada, com dimensões que variam de 4 a 8 µm de comprimento por 2 a 4 µm de largura. Ultraestuturalmente observa-se no mesmo uma película, anéis apicais (ou preconóides), anéis polares, conóide, micronemas, roptrias, microporos, mitocôndria, microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomo, núcleo, grânulos densos, apicoplasto, poro posterior e grânulos de amilopectina, que podem estar, ou não, presentes (Dubey *et al.*, 1998).

Micronemas, roptrias e grânulos densos são organelas secretoras fundamentais para o processo de adesão e invasão do parasito (figura 1). Micronemas têm uma estrutura semelhante a hastes, localizadas na parte anterior do parasito, que liberam proteínas essenciais para a adesão e o movimento de *gliding* (motilidade dependente de actina), utilizados para invadir a célula hospedeira (Ajioka *et al.*, 2001; Kucera *et al.*, 2010). As roptrias, 8 a 10 organelas em forma de clava, estão entre a extremidade anterior e o núcleo, apresentam um estreitamento na parte que fica no interior do conóide. Essas proteínas possuem um papel importante na invasão, pois podem compor a membrana do vacúolo parasitóforo, além de serem encontradas no

citoplasma da célula hospedeira funcionando com uma quinase, alterando a cascata de sinalização intracelular de macrófagos (Ajioka *et al.*, 2001; Butcher *et al.*, 2011). Por fim, os grânulos densos são estruturas esféricas, que se apresentam dispersas no taquizoíta e liberam proteínas logo após a formação do vacúolo parasitóforo, modificando o ambiente local, permitindo a sobrevivência e replicação do parasita. (Dubey *et al.*, 1998; Ajioka *et al.*, 2001).

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2001 Cambridge University Press

Figura 1. Região Apical do *Toxoplasma gondii*. O conóide (B) define a extremidade apical (A) e está envolvido na penetração da célula do hospedeiro. As micronemas (C) liberam proteínas essenciais para a adesão do parasita à célula e o movimento de *gliding*. As proteínas de roptria (D) são liberadas no momento da invasão. Os grânulos densos (E) liberam proteínas após a formação do vacúolo parasitóforo (Figura retirada e adaptada de Ajioka *et al.*, 2001).

2. Proteínas da Superfície de *Toxoplasma gondii* e seu papel na invasão

Há grande interesse no estudo dos ligantes e receptores no processo de adesão e invasão pelo *T. gondii*. A ampla diversidade de células invadidas pelo parasito sugere que um ou mais tipos de receptores são comuns a diferentes células hospedeiras ou que há múltiplos receptores potencialmente presentes (Lourenço, Pereira *et al.*, 2001; Blumenschein, Friedrich *et al.*, 2007).

Os mecanismos moleculares utilizados pelos organismos para reconhecer e invadir as células hospedeiras tem sido alvo de diversas pesquisas. Essa interação pode ser mediada por glicoproteínas, cujos oligossacarídeos corresponderiam a alvos de reconhecimento por proteínas do parasito, facilitando o processo de invasão (Denkers, Butcher *et al.*, 2004).

As espécies incluídas no filo Apicomplexa possuem um modo particular de invadir a célula hospedeira, movimentando-se vigorosamente contra a célula, forçando a sua entrada na membrana celular. A invasão por *Toxoplasma* ocorre em três etapas distintas: (1) adesão, que se inicia pelo contato do taquizoíta com a membrana da célula do hospedeiro; (2) reconhecimento, que se inicia com um movimento denominado *gliding*, que é seguido de disposição perpendicular da região do conóide em relação à membrana celular do hospedeiro; (3) penetração, que culmina com a formação do vacúolo parasitóforo no interior da célula hospedeira (Dobrowolski e Sibley, 1997).

A rápida transição do taquizoíta de um estágio a outro corresponde a um processo finamente regulado, que requer liberação de proteínas de várias organelas do parasito - micronemas, roptrias e grânulos densos (Carruthers e Sibley, 1997). Proteínas de micronemas são as primeiras liberadas pelo taquizoíta no processo de invasão (Carruthers *et al.*, 1999); elas estabelecem uma conexão direta com o sistema actina-miosina do citoesqueleto do parasita (Jewett e Sibley, 2003), viabilizando, dessa maneira, sua motilidade e adesão (Soldati e Meissner, 2004).

A primeira proteína de micronema (MIC) a ser identificada em *T. gondii* foi TgMIC1, que participa da adesão celular (Fourmaux, Achbarou *et al.*, 1996). TgMIC1 é uma proteína de 49 KDa, solúvel e multifuncional, capaz de se ligar a receptores das células do hospedeiro. Na superfície do parasito, apresenta-se complexada com outras duas proteínas de micronema, TgMIC4 e TgMIC6 (Reiss, Viebig *et al.*, 2001), conforme ilustra a figura 2. TgMIC1 é essencial para o transporte de TgMIC4 e

TgMIC6 através das primeiras vias secretórias (retículo endoplasmático e aparelho de Golgi), tornando possível a secreção do complexo na superfície do parasita (Reiss, Viebig *et al.*, 2001; Saouros, Edwards-Jones *et al.*, 2005). O complexo macromolecular é formado pela associação da região β -finger de *TgMIC1* ao segundo domínio *apple* de *TgMIC4* (Marchant, *et al.*, 2012). *TgMIC1* associa-se ainda a *TgMIC6* através de sua porção C-terminal (Friedrich *et al.*, 2010).

Além de *TgMIC1*, *TgMIC4* também é capaz de interagir com células hospedeiras. *TgMIC4* é uma proteína solúvel, adesiva, de 61 KDa, contendo 6 domínios *apple* (A) conservados, que estão expostos extracelularmente (Brencht *et al.*, 2001). Marchant e colaboradores (2012) verificaram que o quinto domínio *apple* de *TgMIC4* é essencial para a interação com glicanos, mais especificamente aqueles que têm galactose como resíduo em posição terminal.

Já *TgMIC6*, uma proteína transmembrana de 34 KDa que se liga a *TgMIC1* por seu domínio EGF (fator de crescimento semelhante ao epidermal), não está diretamente envolvida na adesão a célula hospedeira (Reiss, Viebig *et al.*, 2001).

Estudos com parasitos geneticamente deficientes de cada uma das três proteínas revelaram que *TgMIC1* proporciona a maior força de adesão à célula hospedeira, sendo capaz de manter a adesividade do parasita mesmo na ausência das proteínas *TgMIC4* e *TgMIC6*. Atribui-se a *TgMIC6* um papel essencialmente estrutural, servindo como suporte das duas proteínas realmente adesivas, *TgMIC1* e *TgMIC4* (Saouros, Edwards-Jones *et al.*, 2005).

Figura 2. A: Representação esquemática das estruturas de domínio de *TgMIC1* (alto), *TgMIC4* (meio) e *TgMIC6* (baixo). *Apple* (A), repetição adesiva (MAR), fator de crescimento epidermal (EGF), domínios transmembrânicos e ácidos são mostrados em caixas amarelas, rosas, verdes, cinzas e vermelhas, respectivamente. As posições de aminoácidos correspondentes às extremidades iniciais e finais dos domínios estão indicadas. **B:** Representação esquemática da arquitetura do complexo *TgMIC1-MIC4-MIC6* mostrando os possíveis locais de interação do complexo com a célula hospedeira (setas rosas e vermelhas). (Figura retirada e adaptada de Sauros *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2010) (Marchant *et al.*, 2012).

3. Atividade lectínica do complexo *TgMIC1/MIC4/MIC6*

Os primeiros indícios da propriedade de reconhecimento de açúcar do complexo *TgMIC1/MIC4/MIC6* foram proporcionados pela utilização de uma fração denominada Lac+, obtida do antígeno solúvel total de *T. gondii* (STAg) por afinidade à coluna de lactose-agarose. Constatou-se que essa fração é constituída do complexo *TgMIC1/MIC4* semi-purificado e tem atividade hemaglutinante, seletivamente inibida por lactose, D-galactose e fetuína. Tal propriedade lectínica foi atribuída a *TgMIC1*,

Constituindo-se na primeira descrição de uma proteína ligante de carboidrato de *T. gondii*, propriedade exercida pelo reconhecimento de β -galactosídeos (Lourenço, Pereira *et al.*, 2001).

O estudo estrutural detalhado da molécula de TgMIC1 (Blumenschein, Friedrich *et al.*, 2007) descreve domínios ligantes de ácido siálico, que foram denominados domínios repetidos de adesão (MAR) na porção N-terminal da proteína (TgMIC1-NT). Os resíduos 29 a 259 de TgMIC1-NT compreendem a região de ligação à célula hospedeira (Saouros, Edwards-Jones *et al.*, 2005) (Figura 2A).

Ácido siálico é encontrado com frequência nas extremidades das glicanas de tecidos animais, especialmente em glicoproteínas e gangliosídeos, exercendo papel de grande relevância nos processos de adesão célula-célula (Tolia, Enemark *et al.*, 2005). Glicoproteínas e glicolipídeos contêm uma variedade grande de sialo-oligossacarídeos que são reconhecidos por lectinas ligantes de ácido siálico. Oligossacarídeos que possuem dois ou mais ácidos siálicos terminais são melhor reconhecidos. As regiões MAR de TgMIC1-NT contêm dois sítios ligantes de ácido siálico – MAR1 e MAR2. Dentro dessas duas regiões foram encontrados resíduos conservados e localizados em posições estruturais idênticas, capazes de estabelecer pontes com oligossacarídeos sialilados. Tais domínios ligam-se com alta afinidade e especificidade a glicanas sialiladas de célula de mamífero (Blumenschein, Friedrich *et al.*, 2007), demonstrando ser uma região passível de contribuir para a adesão de *T. gondii* à célula hospedeira.

Como mencionado, está demonstrado que o subcomplexo TgMIC1/MIC4, exposto na superfície de *T. gondii*, interaja com a célula hospedeira. Embora TgMIC4 interaja apenas fracamente com a superfície da célula hospedeira, essa interação se soma à adesão mais forte proporcionada por TgMIC1 (Saouros, Edwards-Jones *et al.*, 2005). A ligação do subcomplexo TgMIC1/MIC4 à lactose, observada por nosso grupo (Lourenço, Pereira *et al.*, 2001), não foi inicialmente confirmada pelo grupo inglês,

ainda que ele tenha identificado um domínio galectina-símile em *TgMIC1* (Blumenschein, Friedrich *et al.*, 2007). Mais recentemente, porém, em trabalho realizado com a nossa colaboração, o grupo liderado por S. Matthews identificou o quinto domínio *apple* de *TgMIC4* como responsável por reconhecimento de galactose (Marchant *et al.*, 2012). As formas recombinantes de *TgMIC1* e de *TgMIC4* permitiram investigar, com maior rigor, a atividade lectínica de cada uma das proteínas.

4. Imunidade ao *Toxoplasma gondii* e papel dos Toll-like Receptors (TLRs)

A resposta imunológica do hospedeiro à infecção por *T. gondii* é complexa e envolve mecanismos celulares e humorais, sendo que a resposta inata corresponde a um passo crucial no estabelecimento da relação parasita-hospedeiro, antes mesmo da montagem da resposta adaptativa.

Neutrófilos, e posteriormente macrófagos, migram para o sítio de infecção, onde secretam uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas (Gazzinelli, Amichay *et al.*, 1996; Denkers, Butcher *et al.*, 2004). Juntamente com outras células, como as dendríticas, cumprem um papel fagocitário importante. O estímulo por *T. gondii* desencadeia a produção de interleucina-12 (IL-12) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por neutrófilos (Scharton-Kersten, Wynn *et al.*, 1996; Bliss, Marshall *et al.*, 1999). A produção de IL-12 é essencial para o desenvolvimento de uma resposta imunológica Th1, protetora contra a infecção. Sabe-se que na ausência de IL-12 os camundongos sucumbem rapidamente à infecção, devido a replicação excessiva do parasita e a posterior destruição tecidual (Denkers, 2010). Macrófagos ativados e células dendríticas são os principais produtores de IL-12 em resposta ao parasito e a seus antígenos (Gazzinelli, Hieny *et al.*, 1993; Fischer, Bonifas *et al.*, 2000; Denkers, 2010). Essa citocina, por sua vez, estimula a síntese de mais IL-12, por um processo de *feedback* positivo. A IL-12 produzida, associada a TNF- α , induz

células *natural killer* (NK) a produzirem interferon- γ (IFN- γ) (Hunter, Subauste *et al.*, 1994). A grande quantidade IFN- γ liberada no microambiente, desencadeia a produção de óxido nítrico (NO) e metabólitos reativos de oxigênio pelos próprios macrófagos, capacitando-os a promover a morte intracelular do protozoário (Scharton-Kersten, Wynn *et al.*, 1996). Portanto, IL-12, TNF- α e IFN- γ são citocinas críticas na resistência ao *T. gondii* (Suzuki, Orellana *et al.*, 1988; Gazzinelli, Hieny *et al.*, 1993; Scharton-Kersten, Wynn *et al.*, 1996). No entanto, é também evidente que a produção dessas citocinas deve ser rigorosamente controlada para se evitar patologias inflamatórias. A citocina IL-10 é fundamental nesse controle, durante a infecção por *T. gondii*. Sabe-se que camundongos knockout para IL-10 sucumbem à infecção com cinética notavelmente similar aos animais deficientes de IL-12 e IFN- γ , o que demonstra a sua importância (Gazzinelli, Wysocka *et al.*, 1996). A morte dos animais desprovidos de IL-10 está associada a baixo número de parasitas e altos níveis de IL-12, TNF- α e IFN- γ , gerando intensa inflamação aguda (Gazzinelli, Wysocka *et al.*, 1996; Suzuki, Sher *et al.*, 2000). Acreditava-se que IL-10 era produzida somente por macrófagos, mas hoje se sabe que células Th1 são uma importante fonte dessa citocina durante infecção por *Toxoplasma* (Jankovic, Kullberg *et al.*, 2007). Além das células Th1, as T reguladoras (Tregs) são importantes fontes de IL-10, o que garante a manutenção da homeostasia da resposta imunológica. Estudos recentes mostraram que as Tregs residuais possuem uma capacidade alta de suprimir a imunidade na infecção aguda por *T. gondii*, resultante do aumento do número de Tregs e da produção de IL-10. Essa resposta ocasiona uma diminuição da proliferação de células T CD4⁺ ou CD8⁺, através de um mecanismo dependente de IL-2 (Tenorio *et al.*, 2011). A ausência de células Tregs na infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos resistentes gerou aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e maior carga parasitária (Morampudi *et al.*, 2011).

Há um grande interesse em se desvendar com precisão como essas respostas complexas são iniciadas durante a infecção por *T. gondii* e outros patógenos. O conceito de que células da imunidade inata utilizam-se de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para responder a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) foi introduzido por Janeway, no final dos anos 1980 (Janeway, 1989). Dez anos depois, Janeway e Medzhitov descobriram os receptores do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like receptors*), que correspondem aos PRRs melhor conhecidos, os quais realizam um papel fundamental no reconhecimento dos PAMPs (Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1997). Mais de dez tipos de TLRs foram identificados em mamíferos e, apesar de serem estruturalmente similares, reconhecem um conjunto extremamente diverso de moléculas microbianas, incluindo proteínas, lipídios, DNA e RNA (Takeda e Akira, 2003; Uematsu e Akira, 2008).

A ativação dos TLRs por ligantes microbianos desempenha um papel importante na iniciação da imunidade para muitos patógenos, incluindo *T. gondii* como demonstrado na tabela que se segue.

Camundongo	Susceptibilidade	Fenótipo	Referência
MyD88 ^{-/-}	Altamente susceptível	Crescimento descontrolado do parasita; defeito na produção de IL-12; aparecimento tardio de resposta Th1.	(Scanga, Aliberti <i>et al.</i> , 2002; Sukhumavasi, Egan <i>et al.</i> , 2008)
TLR 11 ^{-/-}	Resistência intermediária	Maior carga de cistos; camundongos são resistentes a ileíte durante a infecção entérica.	(Yarovinsky, Zhang <i>et al.</i> , 2005; Benson, Pifer <i>et al.</i> , 2009)
TLR 2 ^{-/-}	Resistência intermediária	Camundongos são sensíveis sob condições de alta dose infecciosa.	(Mun, Aosai <i>et al.</i> , 2003)
TLR 4 ^{-/-}	Indeterminada	Ausência de TLR4 confere resistência à patologia intestinal e resulta em aumento da susceptibilidade à infecção por via oral.	(Furuta, Kikuchi <i>et al.</i> , 2006)
TLR 2x4 ^{-/-}	Resistência intermediária	Maior carga de cistos na ausência de TLR4 e TLR2; diminuiu a patologia intestinal durante a infecção entérica.	(Debierre-Grockiego, Campos <i>et al.</i> , 2007; Benson, Pifer <i>et al.</i> , 2009)
TLR 9 ^{-/-}	Resistência intermediária	Diminui a patologia intestinal e aumenta a carga parasitária.	(Minns, Menard <i>et al.</i> , 2006)

Estudos de Weber, Morse e colaboradores (Weber, Morse *et al.*, 2004) revelaram que TLR-2 e TLR-4 são glicosilados e que a glicosilação da TLR4 é necessária para o desempenho de sua função receptora. A importância funcional dos glicanos de TLR4 é refletida no seu alto grau de conservação entre as espécies. Dentre os quatro glicanos associados a TLR2, somente um deles é conservado entre mamíferos e aves, sendo requerido para a secreção do receptor e expressão na membrana celular. Os outras três glicanos exibem grande variabilidade dependente da maturação do TLR2.

Na literatura há poucos relatos de lectinas que se ligam a TLRs (Pluddemann, Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Gay e Gangloff, 2007), como GAL (*galactose-adherence lectin*) de *Entamoeba histolytica* (Campbell, Mann *et al.*, 2000) e SP-A (proteína surfactante A) (Yamada, Sano *et al.*, 2006). A lectina GAL está envolvida na aderência de *E. histolytica* a células do hospedeiro; ela induz um aumento da expressão de TLR2 mRNA em macrófagos (Kammanadiminti, Mann *et al.*, 2004), atua na ativação dessas células e induz a produção de IL-12 (Campbell, Mann *et al.*, 2000). Já a lectina SP-A, principal constituinte da mistura de lipídeos e proteínas presentes nos alvéolos pulmonares, atua na regulação da resposta imune inata pulmonar (Wright, 2005); SP-A interage com o ectodomínio de TLR2, o que faz com que sua presença reduza a ligação de TLR2 a peptideoglicana (PGN) de bactérias gram-positivas. Com isso, há também redução da atividade NFkB induzida por PGN, (Murakami, Iwaki *et al.*, 2002). A presença de glicanos associados a TLR2 e TLR4 motivou a hipótese, investigada por nosso grupo, de que eles corresponderem a alvos de reconhecimento pelos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) de proteínas de micronemas. Essa hipótese se confirmou através de estudos recentes nos quais formas recombinantes de TgMIC1 e TgMIC4 foram utilizadas para estimular células HEK293 transfectadas com TLR4 e TLR2. Constatou-se que rTgMIC1 e rTgMIC4 ativam TLR4 e TLR2, na presença ou ausência de correceptores e moléculas acessórias.

Tais fatos associados à observação anterior de nosso grupo de que a fração Lac⁺ de *T. gondii*, constituída de TgMIC1 e TgMIC4, induz a produção de IL-12 por macrófagos murinos (Lourenço *et al.*, 2001), suscitou a hipótese de que as proteínas de micronema ativassem macrófagos através de mecanismo mediado por TLR2 e/ou TLR4.

No presente trabalho a ativação de macrófagos murinos induzida por TgMIC1 e TgMIC4 é comprovada através de detecção da produção de citocinas e de óxido

nítrico, bem como pelo aumento da atividade migratória e fagocítica dessas células. Ademais, a realização concomitante desses ensaios utilizando macrófagos provenientes de camundongos geneticamente deficientes de TLR2 ou de TLR4, caracterizaram a mediação exercida por tais receptores na ativação de macrófagos promovida pelas proteínas de micronema.

Objetivos

Objetivos

Objetivo Geral

Investigar a propriedade de *TgMIC1* e *TgMIC4* de ativar macrófagos e relacionar tal propriedade com a interação estabelecida por essas proteínas com TLR2 e TLR4.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a indução por *TgMIC1* e *TgMIC4* da ativação de macrófagos, manifesta por produção de citocinas inflamatórias, produção de reativos do nitrogênio, maior motilidade celular e intensificação da atividade fagocítica.
2. Avaliar se as diferentes manifestações de ativação celular induzidas por *TgMIC1* e *TgMIC4* são alteradas em macrófagos derivados de camundongos deficientes de TLR2 ou TLR4.
3. Gerar um camundongo duplo-nocaute para TLR2 e TLR4 para melhor caracterizar a mediação exercida por esses receptores na ativação de macrófagos induzida por proteínas de micronema.

Material e Métodos

Material e Métodos

1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C3H/HePas (WT), deficientes do receptor TLR4 (C3H/HeJ), C57Bl/6 (B6), TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}, de 6 a 8 semanas de idade, disponibilizados pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

2. Purificação de TgMIC1 e TgMIC4 de corpos de inclusão

Escherichia coli da linhagem BL21 (DE3) Rosetta foram previamente transformadas por choque térmico com os plasmídeos de TgMIC1 ou TgMIC4 (Pinzan, 2010) e cultivadas em meio LB acrescido de ampicilina, cloranfenicol e IPTG (0,1 mM/mL), por 4 horas a 37°C. Após a lise das bactérias e análise, em SDS-PAGE, das proteínas da fração precipitada (sedimento) e solúvel, observou-se expressão de TgMIC1 e TgMIC4 apenas nas frações insolúveis, proteínas agregadas, caracterizando a formação de corpos de inclusão.

As proteínas TgMIC1 e TgMIC4 encontradas na fração insolúvel foram purificadas e submetidas ao *refolding* pelo método de diálise, segundo metodologia descrita por Gu *et al.*, 2002, com modificações. As proteínas insolúveis foram ressuspensas em tampão de lavagem (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,2% Triton X-100 e 0,1 mM PMSF, pH 8,3). As amostras foram sonicadas, 4 pulsos de 40 segundos cada, e centrifugadas a 4000 RPM por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido duas a três vezes. Posteriormente, os corpos de inclusão foram ressuspensos em tampão *pré-refolding* (20 mM Tris, 500 mM NaCl e 8 mM Ureia, pH 8,3) e a solução foi incubada em agitação por uma noite à temperatura ambiente. Após completa solubilização dos corpos de inclusão, a amostra foi novamente centrifugada para a

remoção de qualquer material insolúvel, submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de níquel para a remoção de possíveis contaminações com proteínas inespecíficas e então submetida ao *refolding* pelo método de diálise.

3. Refolding de TgMIC1 e TgMIC4 pelo método de diálise

Após cromatografia de afinidade em coluna de níquel, as proteínas recombinantes solubilizadas foram diluídas em tampão de *refolding* (20 mM Tris, 500 mM NaCl e 8 mM Ureia, pH 8,3). As amostras foram dialisadas contra o tampão de *refolding* contendo concentrações decrescentes de uréia (6; 5; 4; 2; 1; 0,5 e 0 M), utilizando-se membrana de diálise (Sigma). Após a remoção de toda a uréia, as amostras foram submetidas a cromatografia de afinidade em coluna com polimixina B imobilizada (Bio-Rad), segundo instruções do fabricante, para eliminar possível contaminação com lipopolissacarídeos (LPS). A concentração de proteínas foi determinada (dosagem com BCA - Bicinchoninic Acid Solution - Sigma) e as amostras armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4. Obtenção e cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Células totais da medula óssea foram retiradas dos fêmures de camundongos e cultivadas em placas de Petri do tipo optilux (não tratadas) com dimensões de 100 x 20 mm, na presença de 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina, 2 mM de glutamina, 25 mM HEPES pH 7,2 e 30% do sobrenadante de cultura de células L929 (LCCM - *L-Cell Conditioned Media*) como uma fonte de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (meio R20/30).

Quatro dias após a adição da medula óssea nas placas de Petri, foram acrescentados mais 10 mL de meio R20/30. No sétimo dia de cultivo, as células foram removidas por lavagem das monocamadas com PBS 1X gelado. Com o objetivo de avaliar a diferenciação dos BMDMs (*Bone Marrow-Derived Macrophage*), ao término da cultura, as células foram incubadas com anticorpo anti-F4/80 murino marcado com ficoeritrina – PE, (Caltag Laboratories South San Francisco, CA) numa concentração de 1:100, e submetidas a análise por citometria de fluxo. A expressão desse receptor da superfície das células foi considerada como um indicador da diferenciação das mesmas em macrófagos.

5. Avaliação da produção de citocinas por macrófagos estimulados com proteínas de micronema de *T.gondii* por ELISA

1×10^6 macrófagos foram plaqueados em placa de 24 poços utilizando meio RPMI-1640, com 10% de soro fetal bovino (1 ml/poço). Estes foram estimulados com TgMIC1 (5 µg/ml) TgMIC4 (5 µg/ml), TgMIC1/4 (5 µg/ml) ou somente meio (controle negativo). Para os controles positivos os macrófagos foram incubados com LPS (2 µg/mL) ou Pam3CSK4 (1 µg/ml) e incubados por 48 horas em estufa a 37°C com 5% CO₂. O sobrenadante da cultura foi coletado e estocado a -20°C para a dosagem das citocinas TNF-α, IL-6, IL-12 (p40) e IL-β por meio de ensaio imunoenzimático (conforme descrito abaixo), e para a dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess (como descrito no item 6).

Em uma placa de 96 poços (Corning) foram adicionados os anticorpos anti-citocina de interesse, numa concentração de 1/250 como anticorpo de captura, diluído em tampão carbonato (100 µL/poço). A placa foi mantida durante uma noite a 4° C. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução tamponada com fosfato 0,6 M,

pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e, incubada por 1 hora (temperatura ambiente), com uma solução de bloqueio constituída de PBS acrescido de 5% de soro fetal bovino (PBS-SFB 5%). Aos poços, foram adicionadas as citocinas recombinantes de interesse para obtenção de curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante, ou as amostras do sobrenadante de cultura de macrófagos seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Então, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T 0,05% e o anticorpo de detecção foi adicionado; a placa foi deixada à temperatura ambiente por 1 hora. O anticorpo de detecção foi preparado previamente e consistia do anticorpo biotinilado (1/500) específico para a citocina testada, adicionado de avidina conjugada à peroxidase (1/250), previamente incubados por 15 minutos. Após nova etapa de lavagens foi adicionada a solução reveladora constituída de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi bloqueada após 15 minutos com ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wavex-BIO-TEK).

6. Dosagem de óxido nítrico (NO)

A concentração de NO no sobrenadante de macrófagos estimulados por 48 horas, como citado anteriormente, foi inferida pela determinação de nitrito, utilizando o método de Griess (Green, Ruiz de Luzuriaga *et al.*, 1981). Em placas de 96 poços, 50 µl do sobrenadante da cultura foram incubados com igual volume do reagente de Griess por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, a absorbância (DO 540 nm) foi determinada em leitor de microplacas (Power Wavex- BIO-TEK). Os resultados expressos em µM foram determinados por comparação com a curva padrão feita com nitrito de sódio (NaNO₂) em concentrações de 200 a 0,78 µM.

7. Ensaio da atividade migratória pelo método de *wound healing*

Para avaliar a capacidade migratória dos macrófagos utilizamos o ensaio de *wound healing*, ou ensaio do risco. Primeiramente, foi feito um risco com caneta preta no fundo da placa de 24 poços, cortando cada poço no sentido horizontal. Em seguida, 1×10^6 macrófagos por poço foram adicionados em placas de 24 poços, contendo 500 μL de meio RPMI 1% SFB. Após o tempo de aderência, e formação de uma monocamada, utilizamos uma ponteira de 200 μL estéril para fazer o risco no sentido vertical. Posteriormente, cada poço foi lavado com PBS1x para retirar as células soltas pela ponteira, e adicionado 1000 μL de meio RPMI 1% SFB juntamente com os estímulos *TgMIC1* (5 $\mu\text{g/ml}$) , *TgMIC4* (5 $\mu\text{g/ml}$), *TgMIC1/4* (2,5/2,5 $\mu\text{g/ml}$), LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), Pam3CSK4 (2 $\mu\text{g/ml}$) na presença de 400 μL de meio RPMI completo. No momento seguinte ao risco, e após cada hora de incubação à 37° C e atmosfera 5% de CO₂, os poços foram fotografados em microscópio óptico invertido. O número de macrófagos que migraram para o *wound healing* foram contados com auxílio do programa *Image J*.

8. Ensaio de atividade fagocítica por microscopia de fluorescência

A atividade fagocítica dos macrófagos foi investigada pela detecção do número de células com capacidade de ingestão de no mínimo uma partícula fluorescente de acordo com o método de Kotani *et al.*, 1998. Para isso, macrófagos derivados de animais C3H/HePas e C3H/HeJ, na quantidade de 5×10^5 células/poço foram cultivados por uma noite sobre lamínulas de 13 mm colocadas em placas de 24 poços sob atmosfera úmida a 37°C contendo 5% CO₂ na presença dos estímulos, em triplicata, *TgMIC1* (5 $\mu\text{g/ml}$) *TgMIC4* (5 $\mu\text{g/ml}$), *TgMIC1/4* (2,5/2,5 $\mu\text{g/ml}$), LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), ou meio.

Após o tempo de estímulo, foi adicionada uma solução de meio RPMI contendo microesferas fluorescentes carboxiladas (Sigma) na proporção de 15 partículas por célula (15:1). Após 30 minutos de incubação a reação foi inibida pela adição de PBS gelado. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x por duas vezes de 5 minutos. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 15 minutos. Foram feitas duas lavagens com PBS 1x de 5 minutos cada, seguidas de permeabilização com 0,3% Triton X-100 por 10 minutos. Após a permeabilização, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS 1x, uma vez com PBS 1x/Glicina 0,1M, duas vezes com PBS 1x. Em seguida, foi feita a incubação com faloidina Alexa 488 (1:100) (Invitrogen) mais DAPI (4,6 - diamidino - 2 - fenilindole, dihidroxicloride) (300 μ M) por 50 minutos. As lamínulas foram lavadas cinco vezes com PBS 1x em ambiente escuro, e montadas em lâminas de vidro com Fluoromount G (EM Science - Gibbstown - New Jersey - EUA). Após secagem em temperatura ambiente, foram fotografados quatro campos de cada lamínula em microscópio de fluorescência Eclipse e800 (Nikon Instruments- Melville, NY, EUA), adquirida num aumento de 20x E 40x com o auxílio da câmara digital Nikon DXM 1200 (Nikon). O número de macrófagos que ingeriram no mínimo uma partícula fluorescente foram contados com o auxílio do programa *Image J*.

9. Extração de DNA e reação de polimerização em cadeia (PCR) para identificar animais duplo nocautes

O DNA dos animais a serem genotipados foi extraído a partir de um pedaço da cauda, adicionada em eppendorff contendo 500 μ L de tampão de lise (10ml de NaCl 5M, 10 ml de Tris 1M pH 7,6, 10 ml EDTA 0,5M, 12,5 ml de SDS 20% e 457 ml de água) mais 10 μ L de proteinase K (20 mg) por uma noite em banho-maria a 56°C. Em

seguida, os tubos foram colocados em gelo por cinco minutos, e então foram adicionados 200 μ L de NaCl saturado (12g NaCl em 100 ml de NaCl 5M), centrifugados a 13000 RPM por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado. Posteriormente, adicionou-se 800 μ L de etanol 100% gelado, misturando os tubos por inversão, que foram centrifugados novamente a 13000 RPM por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 800 μ L de etanol 70%, e os tubos centrifugados a 13000 RPM por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Após 30 minutos de secagem dos tubos na bancada, foram adicionados 100 μ L de água Milli-Q a cada tubo, seguidos de incubação no gelo por duas horas. Finalmente, o DNA foi ressuspendido várias vezes e estocado a -20°C.

A reação de polimerização em cadeia (Polimerase Chain Reaction – PCR) foi feita utilizando uma enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas), de acordo com as indicações do fabricante, utilizando 0,5 μ L de DNA, 2,5 μ L de tampão 10x, 1,5 μ L de MgCl₂ 25mM, 2 μ L de dNTP 2 μ M, 1 μ L de cada primer 10 μ M e 16,25 μ L de água Milli-Q (volume final 25 μ L). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Resultados

Resultados

1. Caracterização das proteínas recombinantes *TgMIC1* e *TgMIC4* utilizadas no estudo

Amostras de *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3) Rosetta transformadas, expressando *TgMIC1* ou *TgMIC4*, cultivadas por 4 horas a 37°C em 500 mL de meio LB Broth, Miller (Neogen, Lansing, Michigan), foram lisadas. Confirmando observações anteriores (Pinzan, 2010), *TgMIC1* e *TgMIC4* foram detectadas, por SDS-PAGE no sedimento (**figura 3A**). O sedimento foi solubilizado com uréia a 8 M e as proteínas nele contidas foram submetidas a processo de *refolding*, pelo método da diálise, que proporcionou, em ambos os casos preparações homogêneas de ambas proteínas recombinantes (**figura 3B**). Eventual contaminação das preparações com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi evitada por adsorção à polimixina B imobilizada, além de pré-incubação com polimixina B por 30 minutos das alíquotas a serem utilizadas em cada experimento. Para avaliar o rendimento proporcionado pelo protocolo, após o procedimento de *refolding* e eliminação de LPS, foi feita a dosagem protéica das preparações obtidas, cujo resultado é mostrado na tabela 1. Partindo de um mesmo volume de bactérias transformadas (500 mL), induzidas em fase log de crescimento (densidade óptica entre 0,4 a 0,6) com IPTG, obtivemos 610,75 µg de *TgMIC1* e 428,57 µg de *TgMIC4*. Essas quantidades cobriram as necessidades dos experimentos subsequentemente realizados.

Figura 3: TgMIC1 e TgMIC4 purificadas a partir de corpos de inclusão. Análise em gel de poliacrilamida (SDS-Page 10%) de amostras de TgMIC1 (10 µg) e TgMIC4 (10 µg) em condições desnaturantes. Coloração realizada por azul de comassie 0,1%. Em A, TgMIC1 e TgMIC4 solubilizadas em uréia 8 M. Em B, TgMIC1 e TgMIC4 após *refolding* pelo método da diálise.

Tabela 1: Dosagem protéica por BCA de TgMIC1 e TgMIC4.

TgMIC1	610,75 µg/ml
TgMIC4	428,57 µg/ml

2. Caracterização dos macrófagos murinos utilizados no estudo

Diferenciamos macrófagos a partir de células da medula óssea de animais deficientes do receptor *toll-like* 4 (C3H/HeJ) e animais controle (C3H/HePas). Posteriormente, com a disponibilidade do camundongo nocaute para o receptor *toll-like* 4 no *background* C57Bl/6, passamos a diferenciar macrófagos da medula óssea de animais C57Bl/6 (B6), TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}. A **figura 4** mostra que o protocolo de diferenciação empregado foi efetivo em todos os casos, já que proporcionou, invariavelmente, suspensões celulares que continham mais de 90% de positividade para a marcação com anti-F480. Sendo assim, os procedimentos adotados para obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) atendiam as exigências dos experimentos a serem realizados.

Figura 4: Porcentagem de macrófagos diferenciados de células da medula óssea (*bone marrow-derived macrophages* - BMDMs) de camundongos. Células totais da medula óssea foram coletadas de camundongos C57Bl/6 (B6, WT), TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}. Elas foram cultivadas em meio com fonte de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), por 7 dias. As células foram incubadas com anticorpo anti-F4/80 conjugado com ficoeritrina (PE) e analisadas por citometria de fluxo em FACs Guava EasyCyte Mini System (Milipore). Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa “CytoSoft4.2” (Guava Technologies). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

3. Proteínas de micronemas de *T.gondii* induzem a produção de citocinas por macrófagos murinos, de maneira dependente da expressão de TLRs

Nosso grupo demonstrou anteriormente que o subcomplexo *TgMIC1/MIC4* nativo (fração Lac+) estimula células esplênicas aderentes a produzirem altas concentrações de interleucina 12 (IL-12) (Lourenço, Pereira *et al.*, 2001).

Com o intuito de averiguar se as proteínas equivalentes recombinantes também ativam macrófagos, avaliamos a produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-12p40 por BMDMs obtidos de camundongos C3H/HePas (TLR4 funcional) e C3H/HeJ (TLR4 não funcional) (figura 5), bem como a produção de TNF- α , IL-6, IL-12p40 e IL-1 β por BMDMs provenientes de camundongos TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e B6 (WT) (figura 6). Como mostra a figura 5, células com TLR4 funcional respondem aos estímulos com *TgMIC1*, *TgMIC4* ou *TgMIC1/4* através de produção de TNF- α , IL-6 e IL-12p40 em relação as células não estimuladas (meio). Adicionalmente, as respostas foram significativamente menores quando células providas de TLR4 não funcional foram utilizadas. O fato de macrófagos com TLR4 não funcional terem respondido ao estímulo com LPS é atribuível à presença de contaminantes (ligantes de TLR2) na preparação comercial de LPS utilizada. Isso nos levou a que utilizássemos LPS ultrapuro nos experimentos subsequentes. A figura 6 mostra que as deficiências geneticamente determinadas de TLR4 ou de TLR2 também levam à queda significativa da produção de TNF- α , IL-6, IL-12p40 e IL-1 β , em comparação a macrófagos de camundongos WT. Mostra ainda que a queda determinada por ausência de TLR4 foi mais acentuada, em todos os casos, do que a determinada por ausência de TLR2. Por outro lado, *TgMIC1*, *TgMIC4* e *TgMIC1/4* mostraram-se similarmente capazes de estimular a produção de citocinas pelos macrófagos de cada uma das origens. Os estímulos controles, LPS para TLR4 e Pam3CSK4 para TLR2 proporcionaram as respostas esperadas nas condições experimentais empregadas.

Figura 5: Indução por *TgMIC1* e *TgMIC4* da produção de citocinas por macrófagos expressando TLR4 funcional ou não funcional. BMDMs de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ foram estimulados por 48 horas com *TgMIC1* (5 µg/ml), *TgMIC4* (5 µg/ml) ou *TgMIC1/4* (2,5/2,5 µg/ml). Meio e LPS (2 µg/ml) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os sobrenadantes das culturas tiveram determinados os níveis de TNF-α, IL-6 e IL-12p40 por ELISA. Resultados expressos em média ± SD e são representativos de dois experimentos independentes. ***p<0,001 (Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

Figura 6: Indução por *TgMIC1* e *TgMIC4* da produção de citocinas por macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR4 ou TLR2. BMDMs de camundongos C57Bl/6 (B6, WT), TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foram estimulados por 48 horas com *TgMIC1* (5 μ g/ml), *TgMIC4* (5 μ g/ml), *TgMIC1/4* (2,5/2,5 μ g/ml). Meio foi utilizado com controle negativo e LPS (2 μ g/ml) ou Pam3CSK4 (2 μ g/ml) como controles positivos. Os sobrenadantes das culturas tiveram determinados os níveis de TNF- α , IL-6, IL-12p40 e IL-1 β por ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ SD e são representativos de três experimentos independentes **p<0,01 e ***p<0,001 (Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

4. Proteínas de micronemas de *T.gondii* induzem a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos de maneira dependente da expressão de TLRs

Considerando que os macrófagos provenientes de camundongos selvagens (WT) são ativados pelas proteínas de micronemas a produzirem citocinas pró-inflamatórias, avaliamos se tais estímulos também levariam à produção de óxido nítrico (NO) e se essa produção seria dependente da expressão de TLR2 ou TLR4. Para tanto, BMDMs de camundongos B6 (WT), TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} foram estimulados, por 48 horas, com *TgMIC1* (5 µg/ml), *TgMIC4* (5 µg/ml) ou *TgMIC1/4* (2,5/2,5 µg/ml). A figura 7 mostra que *TgMIC1*, *TgMIC4* e *TgMIC1/4* demonstraram capacidade similar de induzir a produção de NO. Frente a esses estímulos macrófagos WT produziram cerca de 50 µM de NO, enquanto níveis significativamente inferiores foram produzidos por macrófagos TLR2^{-/-} (35 µM) e TLR4^{-/-} (5 µM).

Figura 7: Indução por *TgMIC1* e *TgMIC4* da produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR4 ou TLR2. BMDMs de camundongos C57Bl/6 (B6, WT), TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foram estimulados por 48 horas com *TgMIC1* (5 µg/ml), *TgMIC4* (5 µg/ml), *TgMIC1/4* (2,5/2,5 µg/ml). Meio foi utilizado com controle negativo e LPS (2 µg/ml) ou Pam3CSK4 (2 µg/ml) como controles positivos. Os sobrenadantes das culturas tiveram determinados os níveis de NO, que foram analisados pelo método de Griess. Resultados expressos em média ± SD e são representativos de três experimentos independentes. ***p<0,001 (Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

5. Proteínas de micronemas de *T.gondii* induzem aumento da motilidade de macrófagos de maneira dependente de TLRs.

Diante das evidências de que proteínas de micronemas promovem a ativação de macrófagos, optamos por avaliar se elas atuavam sobre a capacidade migratória dessas células e se esse efeito poderia ser afetado pela ausência de TLRs. Para tanto utilizamos o ensaio de “wound healing”. Monocamadas de BMDMs obtidos de camundongos B6 (WT), TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} sofreram solução de continuidade (pelo procedimento do “risco”, que corresponde a “wound” ou ferida) e foram estimuladas com TgMIC1 (5 µg/ml), TgMIC4 (5 µg/ml) ou TgMIC1/4 (2,5/2,5 µg/ml), tendo meio como controle negativo e LPS (2 µg/ml) ou Pam3CSK4 (2 µg/ml) como controles positivos. A área da ferida de cada monocamada foi observada por microscopia óptica e fotografada a cada hora, por 6 horas. O aspecto da área e a contagem de células são mostradas na figura 8. Os resultados proporcionados pelos estímulos com TgMIC1 estão no painel A; com TgMIC4, no painel B; com TgMIC1/4, no painel C; com LPS, no painel D; com Pam3CSK4, no painel E; e na ausência de estímulo (meio) no painel F. Cada painel documenta fotograficamente o aspecto da área de ferida, em associação com a representação gráfica do número de células contadas, nos tempos zero, 1 hora, 3 horas e 6 horas. Fica evidente que a ausência de estímulo associou-se à menor ocupação da área por macrófagos, enquanto que nas monocamadas estimuladas houve uma tendência de que a área de ferida fosse mais ocupada por células migrantes no decorrer do tempo. É evidente ainda que as células de animais selvagens tiveram o melhor desempenho migratório, em quase todas as condições testadas; como exceção, tivemos o melhor desempenho de células TLR4^{-/-} frente ao estímulo com Pam3CS4K (painel E). As proteínas de micronemas estimularam eficientemente a migração dos macrófagos WT, desempenho prejudicado quando as células eram deficientes em TLRs. Como mostra a figura 9, a capacidade migratória

das células em 1 hora de estímulo (painel A) foi mais prejudicada em células TLR4^{-/-} (oito a nove vezes menor em relação às células WT) do que TLR2^{-/-} (duas vezes menor em relação às células WT). Entretanto, após 3 horas (painel B), a queda foi similar para ambas as células deficientes (4 a 6 vezes menor do que as células WT).

Figura 8: Indução por proteínas de micronema da migração de macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR4 ou TLR2. Monocamadas de macrófagos formadas em placas de 24 poços sofreram solução de continuidade pelo procedimento do “risco” e foram estimuladas com TgMIC1 (5 µg/ml), TgMIC4 (5 µg/ml) ou TgMIC1/4 (2,5/2,5 µg/ml), tendo LPS (2 µg/ml) ou Pam3CSK4 (2 µg/ml) como controles positivos e meio, como negativo. A migração de macrófagos para a área do risco foi monitorada por 6 horas em microscópio óptico, fotografada com intervalos de 1 hora, sendo o número de células contadas com auxílio do programa *Image J*.

Figura 9: Indução por proteínas de micronema da migração de macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR4 ou TLR2. Monocamadas de macrófagos formadas em placas de 24 poços sofreram solução de continuidade pelo procedimento do “risco” e foram estimuladas com *TgMIC1* (5 µg/ml), *TgMIC4* (5 µg/ml) ou *TgMIC1/4* (2,5/2,5 µg/ml), tendo LPS (2 µg/ml) ou Pam3CSK4 (2 µg/ml) como controles positivos e meio, como negativo. A migração de macrófagos para a área do risco foi monitorada por 6 horas em microscópio óptico, fotografada com intervalos de 1 hora, sendo o número de células contadas com auxílio do programa *Image J*. Em A, migração das células em 1 hora de estímulo, e em B, migração das células em 3 horas de estímulo. Resultados normalizados. *** $p < 0,001$. (Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

6. Proteínas de micronemas de *T.gondii* induzem a atividade fagocítica de macrófagos de maneira dependente de TLR4

Investigamos então se as proteínas de micronema, como ativadoras de macrófagos, seriam capazes de estimular a capacidade fagocítica dessas células e se esse efeito seria afetado por TLR4 ou TLR2.

Num primeiro ensaio, BMDMs de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, após estímulo de 12 horas com *TgMIC1*, *TgMIC4* ou *TgMIC1/4*, tendo LPS e meio como controles positivo e negativo, foram incubados, por 30 minutos, com partículas de látex marcadas com ficoeritrina (PE). Sua internalização pelos macrófagos foi analisada por microscopia de fluorescência (**figura 10**). Os estímulos promoveram similarmente a fagocitose por macrófagos expressando TLR4 funcional, enquanto macrófagos expressando TLR4 não funcional, sob os diferentes estímulos, fagocitaram 58 a 70% menos partículas, inibição que se aproximou da observada em macrófagos C3H/HeJ sob estímulo com LPS (76%) (**figura 10**).

Avaliamos, então, a atividade fagocítica de BMDMs de camundongos B6, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} estimulados com *TgMIC1* (5 µg/ml), *TgMIC4* (5 µg/ml) ou *TgMIC1/4* (2,5/2,5 µg/ml), por 12 horas e, a seguir incubados com partículas de látex marcadas com ficoeritrina (PE), por 30 minutos. Como mostra a figura 11, as lectinas *TgMIC1*, *TgMIC4* ou *TgMIC1/4* induziram aumento da fagocitose por macrófagos WT em relação a células não estimuladas (meio). Adicionalmente, as atividades fagocíticas de macrófagos TLR4^{-/-} estimulados com *TgMIC1*, *TgMIC4* ou *TgMIC1/4* foram respectivamente, 87%, 88% e 85% menores do que a desempenhada por células WT, submetidas aos mesmos estímulos (**figura 11**). Por outro lado, a fagocitose induzida por tais estímulos em macrófagos TLR2^{-/-} foi similar à observada em células WT.

Figura 10: Indução por proteínas de micronema da atividade fagocítica de macrófagos expressando TLR4 funcional ou não funcional. BMDMs de camundongos C3H/HePas (TLR4 funcional) e C3H/HeJ (TLR4 não funcional), após estímulo por 12 horas com *TgMIC1*, *TgMIC4* ou *TgMIC1/4*, tendo LPS e meio como controles positivo e negativo, foram incubados, por 30 minutos, com partículas de látex marcadas com PE. Após lavagem, as células foram incubadas com Faloidina Alexa Fluor 488 e DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindol*) por 50 minutos para marcação de actina e núcleo, respectivamente. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Nikon Instruments- Melville, NY, EUA). Os números de células e de partículas de látex de cada campo fotografado foram obtidos pela contagem com auxílio do programa *Image J*. Resultados expressos em: número de partículas de látex por macrófago.

Figura 11: Indução por proteínas de micronema da atividade fagocítica de macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR4 ou TLR2. BMDMs de camundongos . B6, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}, estimulados por 12 horas com TgMIC1 (5 µg/ml), TgMIC4 (5 µg/ml), TgMIC1/4 (2,5/2,5 µg/ml), tendo Pam3CSK4 (2 µg/ml) ou LPS (2 µg/ml) como controles positivos e meio, como negativo, foram incubados, por 30 minutos, com partículas de látex marcadas com PE. Após lavagem, as células foram incubadas com Faloidina Alexa Fluor 488 e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) por 50 minutos para marcação de actina e núcleo, respectivamente. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Nikon Instruments- Melville, NY, EUA). Os números de células e de partículas de látex de cada campo fotografado foram obtidos pela contagem com auxílio do programa *Image J*. Resultados expressos em: número de partículas de látex por macrófago. Resultados expressos em média ± SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. (Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

9. Geração do camundongo duplo nocaute (DKO TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-})

Com o objetivo de avaliar se a ausência de ambos os receptores (TLR2 e TLR4) poderia prejudicar ainda mais a ativação de macrófagos induzida pelas MICs, após sucessivos cruzamentos, geramos camundongos duplo nocautes para os receptores *toll-like* 2 e 4 (DKO). Os cruzamentos tiveram início com matrizes TLR2^{-/-} e machos TLR4^{-/-}, *background* C57Bl/6, o que originou uma prole F1 heterozigota TLR2^{+/-}/TLR4^{+/-}. Posteriormente, fizemos cruzamentos entre heterozigotos, F1xF1, e obtivemos uma F2 de 110 camundongos, com proporção fenotípica esperada de aproximadamente 56% animais *wild type*, 19% TLR2^{-/-}, 19% TLR4^{-/-} e 6% DKO (**tabela 2**). Realizamos a genotipagem desses animais através da caracterização de DNA genômico extraído da cauda por PCR, utilizando primers TLR2 e TLR4 (**tabela 3**) para identificar alelos nocautes dos camundongos (**figura 12**). Como controle, utilizamos animais sabidamente WT e nocautes para os receptores *toll-like* 2 ou 4, obtidos no Biotério Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Analisando a F2, obtivemos 4 camundongos DKO, 56 *wild-type*, 26 TLR2^{-/-} e 24 TLR4^{-/-}. Com a obtenção de 1 fêmea e 3 machos DKO (**figura 12**) formamos o casal em idade reprodutiva ideal (matriz G x macho H), e, recentemente, obtivemos 4 filhotes que ao atingirem quatro semanas de vida foi feita a genotipagem. Verificamos que todos os filhotes são duplo nocautes, confirmando então a geração de animais DKO para TLR2 e TLR4 (**Figura 13**).

Tabela 2: Proporção fenotípica após o cruzamento TLR2^{+/-}/TLR4^{+/-} x TLR2^{+/-}/TLR4^{+/-} :

TLR2 \ TLR4	+/+	+/-	-/+	-/-
+/+	WT (~ 56%)			TLR4 ^{-/-} (~ 19%)
+/-				
-/+				
-/-	TLR2 ^{-/-} (~ 19%)			DKO (~ 6%)

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para a identificação de camundongos DKO.

Primer	Sequência	Tm
TLR2. 1F	5' – TTGGATAAGTCTGATAGCCTTGCCTCC – 3'	70,4°C
TLR2. 2R	5' – GTTTAGTGCCTGTATCCAGTCAGTGCG – 3'	71,0°C
TLR2. 3R	5' – ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG – 3'	73,8°C
TLR4. 1	5' – GCTTCCCTATTGGACAGCTTAT – 3'	62,2°C
TLR4. 2	5' – AGGGTAGATCCAGAGTTGGAAA – 3'	62,7°C
TLR4. neo	5' – GCCTTCTATCGCCTTCTTGACG – 3'	67,9°C

Figura 12: Análise genotípica de parte dos animais obtidos em F2. Fragmentos referentes aos alelos *wilde type* e nocautes foram obtidos por PCR pela amplificação do DNA genômico, e separados em gel de agarose 1%. Animais controle, WT, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} (A, B e C, respectivamente), quatro animais DKO (D, E, G e H) e um animal TLR4^{-/-} (F).

Figura 13: Resultado do cruzamento matriz G x macho H. Fragmentos referentes aos alelos *wilde type* e nocautes foram obtidos por PCR pela amplificação do DNA genômico, e separados em gel de agarose 1%. F3 formada por quatro animais DKO (fêmeas 1, 2 e 3 e macho 1).

Com o intuito de confirmar se as proteínas de micronemas de *T.gondii* ligam-se nos receptores TLR2 e TLR4, utilizamos macrófagos peritoneais de camundongos duplo nocautes (DKO TLR2^{-/-}TLR4^{-/-}) estimulados com *TgMIC1* (5 µg/ml) ou *TgMIC4* (5 µg/ml). LPS (2 µg/ml) e Pam3CSK4 (2 µg/ml) foram utilizados como controles positivos, e meio de cultura apenas, como controle negativo. Como mostra a figura 14, mesmo a produção sendo menor do que em células de camundongos WT, células de animais TLR2^{-/-} ainda eram capazes de produzir TNF-α, IL-6 e IL-12p40 mediante estímulo com *TgMIC1* ou *TgMIC 4*, e células de animais TLR4^{-/-} ainda eram capazes de produzir TNF-α, IL-6 e IL-12p40 mediante estímulo com *TgMIC1* e TNF-α mediante estímulo com *TgMIC4*. Entretanto, quando células de camundongos DKO foram estimuladas com *TgMIC1* ou *TgMIC 4* a produção de TNF-α, IL-6 e IL-12p40 foi completamente abolida, sendo igual aos controles negativos.

Figura 14: Indução por *TgMIC1* e *TgMIC4* da produção de citocinas por macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR4, TLR2 ou duplo nocaute (DKO). Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 (B6, WT), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-}TLR4^{-/-} (DKO) foram estimulados por 48 horas com *TgMIC1* (5 µg/ml) ou *TgMIC4* (5 µg/ml). Meio foi utilizado com controle negativo e LPS (2 µg/ml) ou Pam3CSK4 (2 µg/ml) como controles positivos. Os sobrenadantes das culturas tiveram determinados os níveis de TNF-α, IL-6 e IL-12p40 por ELISA. Resultados expressos em média ± SD. ND: não detectado. *p<0,05 e ***p<0,001 (Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

Discussão

Discussão

Diversos microorganismos patogênicos sintetizam proteínas ligantes de carboidratos, e através delas, tiram proveito dos glicoconjugados da superfície de células do hospedeiro para aderir a elas, colonizar o tecido e invadir planos profundos. A adesão é, frequentemente, mediada por lectinas da superfície de patógenos e por ligantes glicosilados na superfície da célula hospedeira. Essas interações podem resultar, além da adesão, em eventos de transdução de sinal críticos para a colonização e infecção (Pinzan, 2010).

Sabe-se que, *Toxoplasma gondii* invade ativamente as células de hospedeiros. Essa invasão envolve a liberação do conteúdo de vesículas secretórias localizadas em sua região apical. Dentre elas, podemos citar a organela denominada micronema, que libera proteínas importantes para a adesão à célula hospedeira e para a invasão propriamente dita, viabilizada pelo movimento que executa, denominado *gliding*. É descrito que algumas dessas proteínas podem ser reconhecidas por receptores presentes na célula do hospedeiro, como por exemplo, a profilina, proteína essencial para a motilidade do parasita (*gliding*) dependente da polimerização de actina. A profilina é liberada antes da invasão, e pode ser reconhecida por TLR11, desencadeando produção de IL-12 por macrófagos peritoneais (Kucera *et al.*, 2010).

Existem ainda, as proteínas de micronemas, algumas das quais se constituíram em alvo deste trabalho. Essas proteínas podem formar complexos, como o derivado da associação de TgMIC1, TgMIC4 e TgMIC6. (TgMIC1/4/6). Estudos prévios demonstraram a ligação do subcomplexo TgMIC1/4 à lactose imobilizada (Lourenco, Pereira *et al.*, 2001). Entretanto, um estudo detalhado da estrutura atômica de TgMIC1, realizado pelo grupo Soldati-Favre, em 2010, revelou sua ligação específica ao ácido siálico, e não à lactose. Esses dados favoreceram a ideia de que

TgMIC4, e não *TgMIC1*, fosse responsável pela ligação do subcomplexo à lactose. Recentemente a especificidade de *TgMIC4* por galactose foi demonstrada em amplo estudo, liderado por S. Mathews, que contou com a colaboração do nosso grupo (Marchand, Cowper *et al.*, 2012).

O subcomplexo *TgMIC1/4*, conforme demonstrado por Lourenço e colaboradores (2001), estimula células esplênicas murinas a liberarem IL-12, em níveis similares aos induzidos por antígeno total solúvel, STAg. Além disso, nosso grupo também constatou que macrófagos peritoneais de camundongos sob estímulo de *TgMIC1* e *TgMIC4* recombinantes produzem altos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-12 e aumentam a expressão do receptor *toll* 2 na superfície celular (Lopes, 2012). Verificamos ainda que a ativação de macrófagos peritoneais por *rTgMIC1* e *rTgMIC4* é dependente de TLR2, uma vez que macrófagos de animais nocauteados para o gene de TLR2 tiveram inibida a resposta de produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-12), em relação aos macrófagos de camundongos selvagens (Lopes, 2012). Nosso grupo realizou ainda um estudo utilizando células HEK293 transfectadas com plasmídeos para TLR2/1, TLR2/6 e TLR4. Foi observado que essas células foram ativadas após estímulo com *TgMIC1* e *TgMIC4* recombinantes, através da mensuração da ativação de NFkB e produção de IL-8, revelando haver interação direta das proteínas de micronema com receptores do tipo *toll* (Lopes, 2012). Esse achado é coerente com a descrição de que esses receptores, presentes na superfície de células do sistema imune inato, têm sítios potenciais de *N*-glicosilação. TLR2 possui, comprovadamente, quatro sítios de *N*-glicosilação, importantes para sua secreção e função (Weber *et al.*, 2004). TLR4 possui 10 sítios preditos de *N*-glicosilação, de acordo com o sistema NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Com base em tais dados, o presente trabalho foi delineado no sentido de investigar se as lectinas *TgMIC1* e *TgMIC4* de *Toxoplasma gondii* interagem com as *N*-glicanas

presentes nos receptores do tipo *toll* 2 e 4, de maneira a ativar células da imunidade inata, como macrófagos.

Inicialmente confirmamos que *TgMIC1* e *TgMIC4* recombinantes eram capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e constatamos ser tal produção dependente de TLR2 e TLR4. Observamos que as lectinas induziram alta produção de TNF- α e IL-12 por células esplênicas de camundongos selvagens, resultado que reforça os anteriormente obtidos por nosso grupo ao utilizar o complexo nativo (*TgMIC1/4*, então chamado LAC+) para estimular células esplênicas totais (Lourenço *et al.*, 2001), ou ao utilizar *TgMIC1* e *TgMIC4* recombinantes para estimular macrófagos peritoneais murinos (Lopes, 2012). Kucera e colaboradores, em 2010, verificaram que outra proteína de *T.gondii*, que identificaram como uma profilina-símile, é liberada durante a invasão e corresponde a um ligante de TLR11 de macrófagos, culminando tal interação na produção de IL-12. Debierr-Grockiego e colaboradores, 2010, observaram ainda, que GPIs de *T.gondii* são reconhecidas por galectina-3 em macrófagos, e co-apresentadas a TLR2 e TLR4, ativando a produção de TNF- α .

Além da produção de TNF- α e IL-12, observamos que *rTgMIC1* e *rTgMIC4* induzem alta produção de IL-6, citocina reconhecidamente importante no controle do sistema imune e hematopoiético. IL-6 é responsável por estimular a síntese de proteínas de fase aguda, bem como a produção de neutrófilos na medula óssea. Pode ser secretada por macrófagos em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo *Toll* (Marcovecchio *et al.*, 2012). Esse resultado corrobora com recentes observações do nosso grupo, de que macrófagos peritoneais estimulados com as MICs produzem níveis significativos de IL-6, produção essa demonstrada ser dependente de TLR2 (Lopes, 2012). Observamos ainda haver

produção de IL-1 β , citocina que medeia respostas inflamatórias e está envolvida com a proliferação, diferenciação e apoptose celular.

Como mencionado, verificamos que a citada produção das citocinas pró-inflamatórias é dependente dos receptores TLR2 e TLR4, já que a produção de TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β estimulada por *TgMIC1* e *TgMIC4* foi inibida pela utilização de macrófagos derivados de animais nocautes para esses receptores. Esse fato foi considerado sugestivo de que as *N*-glicanas presentes nos ectodomínios de TLR2 e TLR4 corresponderem a alvos do reconhecimento pelas lectinas de *T. gondii*, estabelecendo interações que seriam responsáveis pela ativação celular e desencadeamento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em estudo recente, havíamos demonstrado que macrófagos peritoneais de animais nocautes para TLR2 produzem níveis de TNF- α , IL-6 e IL-12 que são inferiores aos produzidos por células de selvagens (Lopes, 2012). Demonstramos agora que os efeitos de *TgMIC1* e *TgMIC4* são mais dependentes de TLR4 do que de TLR2, pois a produção dessas citocinas por macrófagos TLR4^{-/-} foi similar a verificada nos controles negativos. Esses resultados sugerem que *N*-glicanas presentes nos receptores do tipo *toll* 4 sejam alvos mais adequados para as MICs do que as presentes em TLR2. Essa seletividade por glicanas de um ou outro TLR já foi demonstrada anteriormente em estudos com lectinas de plantas. ArtinM, lectina imunomoduladora estudada por nosso grupo, liga-se seletivamente a glicanas de TLR2, enquanto que um *screening* de diversas lectinas de plantas quanto à capacidade de ativar TLRs extracelulares revelou padrões de reconhecimento que variaram bastante, como ilustram os seguintes exemplos: (a) PHA-L, ligante de N-acetil glucosamina, estimulou todos os TLRs extracelulares; (b) SBA, e PNA, ambas ligantes de galactose e N-acetil galactosamina, ativaram apenas TLR4; (c) ConA, ligante de manose e glucose, ativou apenas heterodímeros constituídos de TLR2 e TLR6; (d) AIL, ligante de galactose de galactose e N-acetil galactosamina, revelou-se incapaz de ativar qualquer dos TLRs

ensaiados; (e) WGA, ligante de N-acetil glucosamina/ácido siálico, foi a lectina mais promíscua, ativando todos os TLRs com exceção do 3 e 4. Da mesma maneira, lectinas de patógenos e de mamíferos mostraram seletividade de ligação a TLRs. GAL (*galactose-adherence lectin*) de *Entamoeba histolytica* (Campbell, Mann *et al.*, 2000) ativa TLR2 e induz a produção de IL-12 (Campbell, Mann *et al.*, 2000). A lectina SP-A, caracteristicamente presente nos alvéolos pulmonares, interage com o ectodomínio de TLR2 (Murakami, Iwaki *et al.*, 2002).

A produção de NO por macrófagos pode ser desencadeada em resposta a infecções por uma grande variedade de organismos como bactérias, fungos e parasitos (Cardoni *et al.*, 1990), sendo um microbicida essencial para a resolução da infecção por parasitos (Silva *et al.*, 2003). De acordo com a literatura, camundongos infectados por *T. gondii* apresentam produção aumentada de IFN- γ e NO (Nishikawa *et al.*, 2007). Além disso, macrófagos J774A.1 infectados com a forma taquizoíta do parasito também produzem altos níveis de IFN- γ e NO (Nishikawa *et al.*, 2007). Sabe-se que lectinas podem ativar células do sistema imune, levando-as a exacerbar suas funções anti-microbicas e anti-tumorais. Concanavalina A, por exemplo, ativa macrófagos peritoneais murinos a produzirem NO, *in vitro* (Andrade *et al.*, 1999). A lectina ArtinM, de sementes de *A. heterophyllum*, induz macrófagos e células dendríticas a produzirem IL-12, de maneira a estimular, quando administrada *in vivo*, respostas Th1, com produção de NO, protetoras contra infecções por patógenos intracelulares, como *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis*, *Neospora caninum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. A lectina paracoccina, ligante de N-acetil glucosamina e presente na superfície de leveduras de *P. brasiliensis*, também estimula macrófagos murinos a produzirem NO, contribuindo para a atividade fungicida dessas células (Coltri *et al.*, 2006). Verificamos que macrófagos murinos estimulados com as lectinas de *T. gondii* são capazes de produzir altos níveis desse importante microbicida. Essa produção foi menor por macrófagos destituídos de TLR2 ou TLR4. Mais uma vez, a

ativação do macrófago mostrou-se mais dependente do receptor TLR4, uma vez que os níveis de NO produzidos por células com ausência desse receptor foi similar à do controle negativo. Esses dados sugerem, que receptores do tipo *toll* 2 e 4 são vias importantes de reconhecimento e ativação de macrófagos pelas lectinas de *T. gondii*, sendo o TLR4 um receptor crucial para essa interação.

Macrófagos são células com excelente capacidade migratória, pois derivam-se de monócitos do sangue periférico, capazes de emigrar fisiologicamente da corrente sanguínea para constituir o pool de macrófagos residentes no tecido conjuntivo. É descrito que MCP-1, uma citocina quimioatraente de monócitos, é capaz de recrutar fibroblastos, macrófagos, células musculares lisas e células endoteliais *in vitro* e *in vivo* (Hoh *et al.*, 2011). Outros estímulos também induzem a migração de macrófagos. Kleveta e colaboradores, em 2012, observaram que macrófagos J774A.1 estimulados com LPS, na ausência de quimioatraente, apresentaram maior migração na primeira hora após o estímulo, em relação ao grupo controle. Wu e colaboradores, 2009, também verificaram que macrófagos estimulados com LPS, apresentam maior atividade migratória em relação as células não estimuladas. O grupo verificou, ainda, que macrófagos tratados com RNA de interferência para TLR4, quando estimulados com LPS, na ausência de quimioatraente, migraram menos do que os não silenciados para TLR4. Isso sugere que a ausência do receptor *toll* 4 na superfície das células, ao impossibilitar o reconhecimento do LPS, prejudica a ativação dos macrófagos, que consequentemente, diminuem sua atividade migratória. Nesse contexto, nosso grupo observou que macrófagos WT estimulados com as proteínas de micronema, na ausência de quimioatraente, são capazes de aumentar sua motilidade em relação aos macrófagos não estimulados. Entretanto, macrófagos deficientes dos receptores *toll* 2 ou 4 apresentaram atividade migratória menor do que as células selvagens em resposta as MICs, logo na primeira hora após o estímulo. As células que não expressavam TLR4 migraram ainda menos no tempo observado. Esses resultados

sugerem que a ativação de macrófagos WT pelas MICs provoca aumento da atividade migratória celular, em relação a macrófagos não estimulados. Além disso, a ausência dos receptores do tipo *toll*, principalmente TLR4, prejudica a ativação dos macrófagos pelas lectinas, o que resulta em redução da capacidade migratória dessas células.

Os macrófagos estão estrategicamente localizados em vários tecidos do corpo, onde ingerem e processam desde células apoptóticas a patógenos, cooperando para o sucesso da resposta inflamatória (Murray e Wynn, 2011). Essas células exibem uma alta diversidade de receptores de superfície, que são essenciais para completa execução de suas funções em defesa ao hospedeiro, incluindo alcançar o sítio de infecção e remover organismos estranhos através da fagocitose (Park *et al.*, 2011). É descrito que macrófagos alveolares, após trauma do tórax, secretam altos níveis de TNF- α , além de liberarem quimiocinas para atrair neutrófilos, quando incorporam partículas de látex, sugerindo a importância do aumento da fagocitose durante a inflamação pós-traumática (Seitz *et al.*, 2011). Sabe-se que, muitas vezes, a fagocitose e o *clearance* inicial de alguns patógenos são cruciais para o combate de possíveis infecções causadas por eles. Nesse caso, a participação de receptores do tipo *toll* é essencial no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, para que macrófagos, por exemplo, executem a fagocitose e o *clearance* com sucesso. Nesse contexto, Descamps e colaboradores, 2012, verificaram a importância de TLR5 no *clearance* de *Pseudomonas aeruginosa* por macrófagos alveolares *in vivo* e *in vitro*, associado ao aumento na produção de IL-1 β importante para a acidificação do pH endossomal e morte da bactéria. O grupo observou ainda, que animais nocautes para TLR5 apresentaram redução na produção de IL-1 β e, conseqüentemente, menor *clearance* bacteriano. Wu e colaboradores, 2009, verificaram ainda, que macrófagos estimulados com LPS, apresentam maior atividade fagocítica em relação a células não estimuladas. O grupo observou também, que macrófagos tratados com RNA de interferência para TLR4, quando estimulados com

LPS, apresentaram menor fagocitose do que os que expressavam TLR4. Isso sugere que a ausência do TLR4 na superfície das células, ao impossibilitar o reconhecimento do LPS, prejudica a ativação dos macrófagos, que conseqüentemente, diminuem sua atividade fagocítica. Em nosso trabalho, demonstramos que macrófagos WT estimulados com as proteínas de micronema de *T.gondii* apresentaram maior fagocitose em relação a macrófagos não estimulados. Entretanto, macrófagos deficientes do receptor *toll* 4 apresentaram menor atividade fagocítica quando comparadas a células selvagens, em resposta as MICs. No entanto, as células com ausência do receptor TLR2 não apresentaram diferença na fagocitose em relação aos macrófagos WT. Esses resultados sugerem que a ativação de macrófagos selvagens pelas MICs provoca aumento da fagocitose, e que a ausência do receptor *toll* 4, prejudica a ativação dos macrófagos pelas lectinas, resultando em redução da capacidade fagocítica dessas células.

Os dados aqui apresentados indicam que as vias dos receptores do tipo *toll* 2 e 4 são cruciais para a interação e ativação de macrófagos pelas proteínas de micronema de *T. gondii*. Com base nisso, nosso grupo considerou necessário, para dar andamento aos estudos, gerar camundongos duplo nocautes para os receptores TLR2 e TLR4. Os resultados preliminares obtidos com macrófagos desses animais DKO, nos permitem sugerir que as proteínas de micronemas de *T.gondii* reconhecem especificamente as *N*-glicanas de TLR2 e TLR4, visto que na ausência de ambos receptores, um importante marcador de ativação celular, que é a produção das citocinas pró-inflamatórias, foi completamente abolida. Sendo assim, essa nova ferramenta deverá permitir melhor avaliar o papel desses receptores no que diz respeito à interação com as lectinas de *T. gondii* e seus reflexos imunobiológicos.

Ainda há necessidade de grande investimento de esforços para uma compreensão realística e global da importância das interações estabelecidas pelas

proteínas de micronema de *T.gondii* (*TgMIC1* e *TgMIC4*) com receptores de superfície de macrófagos (TLRs), bem como a ativação celular desencadeada por tais interações. A expectativa é de que esses esforços resultem em melhor compreensão do processo de adesão parasitária e da resposta imune gerada por *T. gondii*.

Conclusões

Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo nos levam a concluir que:

1. As proteínas de micronemas de *Toxoplasma gondii*, TgMIC1 e TgMIC4, interagem com os receptores do tipo *toll* 2 e 4 expressos por macrófagos, culminando em ativação celular.

2. A interação com TLR4 parece ser mais decisiva do que a estabelecida com TLR2 para que ocorram as manifestações de ativação celular, com destaque para a produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, capacidade migratória e fagocítica.

Referências Bibliográficas

- Ajioka, J.W., Fitzpatrick J.M., Reitter C.P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev. Mol. Med. Jan, p.1-19. 2001
- Andrade, J.L., Arruda, S., Barbosa, T. et al. Lectin-induced nitric oxide production. Cellular Immunology., v.194, n.1, May, p.98-102. 1999.
- Benson, A., R. Pifer, et al. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. Cell Host Microbe, v.6, n.2, Aug 20, p.187-96. 2009.
- Black, M. W. e J. C. Boothroyd. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev, v.64, n.3, Sep, p.607-23. 2000.
- Bliss, S. K., A. J. Marshall, et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. J Immunol, v.162, n.12, Jun 15, p.7369-75. 1999.
- Blumenschein, T. M., N. Friedrich, et al. Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. EMBO J, v.26, n.11, Jun 6, p.2808-20. 2007.
- Brencht, S.; Carruthers,V.B., Ferguson,D.J.P et al. The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. Jounal Biology Chemistry, v. 276, p. 4119-4127, 2001.
- Butcher B.A., Fox B.A., Rommereim L.M. et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase **ROP16** activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. PLoS Pathog., v.9, Sep 7. 2011.
- Campbell, D., B. J. Mann, et al. A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages. Eur J Immunol, v.30, n.2, Feb, p.423-30. 2000.
- Cardoni R.L., Rottenberg M.E., Segura E.L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Cell Immunol., v.1, n.128, Jun, p.11-21. 1990.
- Carruthers, V. B. e L. D. Sibley. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol, v.73, n.2, Jun, p.114-23. 1997.
- Carruthers, V.B.; Giddings, O.K.; Sibley, L.D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. Cell Microbiology, v. 1, p.225-235, 1999.
- Coltri KC, Casabona-Fortunato AS, Gennari-Cardoso ML, et al.. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. Microbes Infect., v.8, n.3, p.704-13. 2006.

- Chowdhury, M. Toxoplasmosis: a review. J. Med., v.17, p.373-96, 1986.
- Debierre-Grockiego, F., M. A. Campos, *et al.* Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. J Immunol, v.179, n.2, Jul 15, p.1129-37. 2007.
- Debierre-Grockiego F., Niehus S., Coddeville B. *et al.* Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. J. Biol. Chem., v.43, n.285, Oct, p.32744-50. 2010.
- Denkers, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. J Biomed Biotechnol, v.2010, p.737125. 2010.
- Denkers, E. Y., B. A. Butcher, *et al.* Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. Int J Parasitol, v.34, n.3, Mar 9, p.411-21. 2004.
- Descamps D, Le Gars M, Balloy V. Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1 β secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. Proc. Natl. Acad. Sci., v.109, n.5, Jan, p.1619-24. 2012.
- Dobrowolski, J. e L. D. Sibley. The role of the cytoskeleton in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Behring Inst Mitt, n.99, Mar, p.90-6. 1997.
- Dubey, J. P., R. M. Weigel, *et al.* Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. J Parasitol, v.81, n.5, Oct, p.723-9. 1998.
- Fischer, H. G., U. Bonifas, *et al.* Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. J Immunol, v.164, n.9, May 1, p.4826-34. 2000.
- Fourmaux, M. N., A. Achbarou, *et al.* The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. Mol Biochem Parasitol, v.83, n.2, Dec 20, p.201-10. 1996.
- Friedrich N., Santos J.M., Liu Y. *et al.* Members of a novel protein family containing microneme adhesive repeat domains act as sialic acid-binding lectins during host cell invasion by apicomplexan parasites. J. Biol. Chem., v. 3, Jan 15, p.2064-76. 2010.
- Furuta, T., T. Kikuchi, *et al.* Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. Int Immunol, v.18, n.12, Dec, p.1655-62. 2006.
- Gay, N. J. e M. Gangloff. Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu Rev Biochem, v.76, p.141-65. 2007.
- Gazzinelli, R. T., D. Amichay, *et al.* Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol, v.219, p.127-39. 1996.
- Gazzinelli, R. T., S. Hieny, *et al.* Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.13, Jul 1, p.6115-9. 1993.

- Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, *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 overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. J Immunol, v.157, n.2, Jul 15, p.798-805. 1996.
- Green L.C., Ruiz de Luzuriaga K., Wagner D.A. *et al.* Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci., v.78, n.12, Dec, p.7764-8. 1981.
- Hoh B.L., Hosaka K., Downes D.P. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway. Circulation, v.124, n.20, Nov, p.2243-52. 2011.
- Hunter, C. A., C. S. Subauste, *et al.* Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. Infect Immun, v.62, n.7, Jul, p.2818-24. 1994.
- Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.54 Pt 1, p.1-13. 1989.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, *et al.* Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. J Exp Med, v.204, n.2, Feb 19, p.273-83. 2007.
- Jewett, T. J. e L. D. Sibley. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. Mol Cell, v.11, n.4, Apr, p.885-94. 2003.
- Kammanadiminti, S. J., B. J. Mann, *et al.* Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. FASEB J, v.18, n.1, Jan, p.155-7. 2004.
- Kleveta, G., Borze, K., Zdioruk, M. *et al.* LPS Induces Phosphorylation of Actin-Regulatory Proteins Leading to Actin Reassembly and Macrophage Motility. Journal of Cellular Biochemistry, v.113, p.80-92. 2012.
- Kotani N., Hashimoto H., Sessler D.I. *et al.* Intraoperative modulation of alveolar macrophage function during isoflurane and propofol anesthesia. Anesthesiology, v.89, p.1125–32. 1998.
- Kucera K., Koblansky A.A., Saunders L.P. *et al.* Structure-based analysis of *Toxoplasma gondii* profilin: a parasite-specific motif is required for recognition by Toll-like receptor 11. J Mol. Biol. V.403, n.4, Nov, p.616-629. 2010.
- Lpes, C.D. **Dissecção molecular da interação de proteínas 1 e 4 de micronema de *Toxoplasma gondii* com glicanas de TLRs (Toll-like Receptors)**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- Lourenco, E. V., S. R. Pereira, *et al.* *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. Glycobiology, v.11, n.7, Jul, p.541-7. 2001.
- Marchant J., Cowper, B., Liu, Y. *et al.* Galactose recognition by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. Mar 7, 2012.

Marcovecchio, M.L., Mohn A., Chiarelli F. Inflammatory cytokines and growth in childhood. Curr. Opin Endocrinol Diabetes Obes., v.1, n.19, Feb, p.57-62. 2012.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, *et al.* A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, v.388, n.6640, Jul 24, p.394-7. 1997.

Minns, L. A., L. C. Menard, *et al.* TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. J Immunol, v.176, n.12, Jun 15, p.7589-97. 2006.

Morampudi V., De Craeye S., Le Moine A. *et al.* Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. Microbes Infect., v.13, n.4, Apr, p.394-404. 2011.

Morissette, N.S.; Bedian, V.; Webster, P.; Roos, D.S. Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. Experimental Parasitology, v. 70, p. 445-459, 1994.

Mun, H. S., F. Aosai, *et al.* TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. Int Immunol, v.15, n.9, Sep, p.1081-7. 2003.

Murakami, S., D. Iwaki, *et al.* Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- α secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. J Biol Chem, v.277, n.9, Mar 1, p.6830-7. 2002.

Murray, P.J., Wynn, T.A. *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.* Nature Reviews Immunology, v.11, p.723-737. 2011.

Nishikawa, Y., Kawase, O., Vielemeyer, O. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. Parasite Immunology, v.29, p.375-385. 2007

Park H., Ishihara D., Cox D. Regulation of tyrosine phosphorylation in macrophage phagocytosis and chemotaxis. Arch Biochem Biophys., v.2, n.510, Jun, p.101-111. 2011.

Pinzan, C.F. **Proteínas de micrônomas de *Toxoplasma gondii*: avaliação estrutural e das atividades biológica e vacinal.** 149 p.. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Pluddemann, A., S. Mukhopadhyay, *et al.* The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. Expert Rev Mol Med, v.8, n.28, p.1-25. 2006.

Reiss, M., N. Viebig, *et al.* Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. J Cell Biol, v.152, n.3, Feb 5, p.563-78. 2001.

Sauros, S., B. Edwards-Jones, *et al.* A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. J Biol Chem, v.280, n.46, Nov 18, p.38583-91. 2005.

Seitz DH, Palmer A, Niesler U. Alveolar macrophage phagocytosis is enhanced after blunt chest trauma and alters the posttraumatic mediator release. Shock, v.36, n.6, Dec, p.621-627. 2011.

Silva J.S., Machado F.S., Martins G.A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front. Biosci., v.8, May, p.314-25. 2003.

Scanga, C. A., J. Aliberti, *et al.* Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. J Immunol, v.168, n.12, Jun 15, p.5997-6001. 2002.

Scharton-Kersten, T. M., T. A. Wynn, *et al.* In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. J Immunol, v.157, n.9, Nov 1, p.4045-54. 1996.

Soldati, D. e M. Meissner. *Toxoplasma* as a novel system for motility. Curr Opin Cell Biol, v.16, n.1, Feb, p.32-40. 2004.

Sukhumavasi, W., C. E. Egan, *et al.* TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. J Immunol, v.181, n.5, Sep 1, p.3464-73. 2008.

Suzuki, Y., M. A. Orellana, *et al.* Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science, v.240, n.4851, Apr 22, p.516-8. 1988.

Suzuki, Y., A. Sher, *et al.* IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol, v.164, n.10, May 15, p.5375-82. 2000.

Takeda, K. e S. Akira. Toll receptors and pathogen resistance. Cell Microbiol, v.5, n.3, Mar, p.143-53. 2003.

Tenorio E.P., Fernández J., Castellanos C. *et al.* CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. Eur. J. Immunol., v.41, n.12, Dec, p.3529-41. 2011.

Tenter, A. M., A. R. Heckerroth, *et al.* *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol, v.30, n.12-13, Nov, p.1217-58. 2000.

Tolia, N. H., E. J. Enemark, *et al.* Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Cell, v.122, n.2, Jul 29, p.183-93. 2005.

Uematsu, S. e S. Akira. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. Handb Exp Pharmacol, n.183, p.1-20. 2008.

Weber, A. N., M. A. Morse, *et al.* Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. J Biol Chem, v.279, n.33, Aug 13, p.34589-94. 2004.

Wright, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. Nat Rev Immunol, v.5, n.1, Jan, p.58-68. 2005.

Yamada, C., H. Sano, *et al.* Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. J Biol Chem, v.281, n.31, Aug 4, p.21771-80. 2006.

Yarovinsky, F., D. Zhang, *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science, v.308, n.5728, Jun 10, p.1626-9. 2005.