ALÉX MARTINS NASARÉ

Participação do epitélio pigmentado da retina na infecção por *Toxoplasma gondii in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IMT/FMUSP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração. Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Carlos Tedesco

São Paulo

2021

ALÉX MARTINS NASARÉ

Participação do epitélio pigmentado da retina na infecção por *Toxoplasma gondii in vitro*

Tese apresentado ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IMT/FMUSP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Carlos Tedesco

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nasaré, Alex Martins
Participação do epitélio pigmentado da retina na infecção pro Toxoplasma gondii in vitro / Alex Martins Nasaré. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientador: Andrés Jimenez Galisteu Junior.
Coorientador: Roberto Carlos Tedesco.

Descritores: 1.Toxoplasmose ocular 2.Movimento celular 3.Epitélio pigmentado da retina 4.Citocinas 5.Imunização 6.Toxoplasma

USP/FM/DBD-331/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho a minha *família*, que me deu suporte durante esta longa jornada, em especial a minha tia *Marisa Martins* que diante de todas as dificuldades sempre se mostrou forte, me servindo de inspiração.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por me possibilitar ter forças e pessoas que me possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos meus Orientadores, **Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.** e **Prof. Dr. Roberto Carlos Tedesco**, que me acompanham desde a época do mestrado, dando suporte e sendo críticos, me alavancando ao sucesso.

Ao **Luciano Monteiro**, a **Sandra Regina**, a **Marilda** e a **Cleusa Takakura** pelo esforço e dedicação no auxílio de todos do laboratório direta ou indiretamente, contribuindo para a execução deste projeto.

As secretarias **Eliane Araújo** e **Gislaine Matheus** pelo auxílio técnico e todas as rematrículas salvas.

A **Dra. Luciana Ekman**, pelo seu posicionamento nas práticas corretas do uso de animais de laboratório

Ao Biotério de experimentação animal, pelo fornecimento de animais para a execução deste trabalho.

Aos meus pais **Márcia Helena Martins Nasaré** e **Wilmar Vicente Nasaré**, que sempre me escutaram, e me auxiliaram na definição dos meus caminhos, e que com orgulho sempre falam de seus filhos com carinho e peito cheio.

Ao meu irmão **Alexandre Martins Nasare**, e minha cunhada **Michele Agda Muramoto**, primeiramente por estarem presente e segundo pela sobrinha maravilhosa que me presentearam **Rafaella Saori**.

Ao meu companheiro de jornada **Higor Rodrigues Gomes** e a minha cunhada **Kauany Rodrigues Gomes**, por se fizeram casa a todo instante, seja no *home office*, ou na cervejinha gelada de fim de semana.

Aos meus Padrinhos **Rogério**, **Tereza**, **Mário** e **Alice**, pelo carinho e compreensão deste período de estudos e trabalhos, associados a pandemia, que por mais difícil que fosse estarmos próximo, sempre se fizeram presentes.

Aos meus avós maternos **Lúcia Helena** e **Geraldo**, que me escutaram, aconselharam e sempre mandaram mensagens ao longo deste período; aos meus avós paternos **Ataíde Vicente** e **Otilde Vicente**, que *in memoriam*, acompanharam e

vigiaram cada passo, em especial a minha avó que partiu durante este período de pandemia que ocorre atualmente, mas que sempre fazia questão de deixar uma mensagem com um “A vó te ama muito”, até o último de seus dias.

A minha prima linda **Ana Julya** e **Bárbara Lacerda**, que sempre alegraram meus dias, com suas risadas, mesmo nas dificuldades.

As minhas melhores amigas **Gabriela Leal** e **Thaiza Menegassi**, e suas famílias, pelos acolhimentos, as conversas aleatórias e as sérias também, mas que sempre estiveram juntas de mim em todos os momentos.

Ao laboratório de Protozoologia (**Andréa, Jaque**, **Camila**, **Thiago**, **Gisele** e **Luís**), por todo o suporte que me deram psicológico, emocional, físico, laboratorial, tudo, tudo, e tudo... Incluindo a **Ana**, do IPEN, pelas coberturas.

Pelo laboratório de Oftalmologia da UNIFESP (**Priscila**, **Lucy**, **Renata**, **Viviane**, **Leonardo**, **Thainá**, **Larissa** e **Cecilia**), pelo apoio e conselhos, auxílio em alguns experimentos e todo o carinho e acolhimento que desde a época de iniciação científica obtive.

Ao laboratório de Terapia Gênica do **Prof. Dr. Sang Won Han** e todos seus alunos e colaboradores (**Bianca Bonetto**, **Tamisa**, **Joana Serra**, **Marcela**, **Maycon**, **Patricia T.**, **Juliana**, **Julia Benincasa** e **Lucas Mello**) por todo o acolhimento, auxílio nos experimentos, ideias e muitos *coffee breaks*.

Ao laboratório da **Profa. Dra. Karina Bortolucci** por serem facilitadores na síntese deste trabalho, com o empréstimo de cepas, que não só reluzem, mas facilitaram a identificação de parte deste trabalho; além de minha companheira de trabalho **Elisabete Souza** (Best-inha), que sempre está pronta a ajudar e juntos enfrentamos muitas batalhas.

Aos meus companheiros da especialização em Acupuntura (**Elaine**, **Luciano**, **Cris**, **Soraya**) por ouvirem minhas reclamações o tempo todo, e nunca desistirem de mim.

Ao tio **Fernando Seiji**, pois sem ele sei que não estaria no meio acadêmico, além de estar presente nessa jornada há muito tempo.

Aos meus amigos **Carlos Corsi** e **Estevan**, pelas risadas, os bons dias e as conversas.

Um agradecimento especial ao professor **Dr. Luis Alonso**, que sempre me incentivou na vida acadêmica, desde o nosso primeiro encontro, quando apostou suas fichas em mim, e que mesmo não tendo participado efetivamente da síntese deste trabalho como um dos orientadores, incentivava-me e o faz até hoje, por toda a sua história e as experiencias do mestrado.

"...é uma surpreendente história de coragem e resistência diante da extrema dificuldade e das trágicas circunstâncias em que ele se encontrava. Pela experiência deste investigador, pode-se afirmar que o que esse rapaz viveu não tem paralelo em toda a história da navegação. Poucos náufragos podem dizer que sobreviveram por tanto tempo no mar quanto o sr. Patel, e nenhum deles em companhia de um tigre-de-bengala adulto."

As Aventuras de Pi, Martel, Yann

LISTA DE ABREVIATURAS

EPR	Epitélio pigmentado da retina
VEGF	*Vascular endotelial growth factor* (do inglês: Fator de crescimento endotelial vascular
IGF	Insulin Growth Factor (do inglês: Fator de crescimento semelhante à Insulina)
TSP	*Thrombospondin*
IL	*Interleucin* (do inglês: interleucina)
IFN	Interferon
NK	*Natural Killer*
TLR	*Toll Like Receptor* (do inglês: Receptor *Toll-like*)
CCR	Receptor de quimiocinas
MyD	Fator de diferenciação mielóide
STAT	Transdutor de sinais e ativadores de transcrição
TNF	*Tumor necrosis fator* (do inglês: fator de necrose tumoral)
RNAm	Ácido Ribose nucleico mensageiro
NF	*Nuclear fator* (do inglês: fator nuclear)
ROP	*Rhoptry protein* (do inglês: proteína da róptria)
DNA	Ácido Desoxirribose nucleico
CD	*Cluster-differentiation*
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF	*Tumor growth factor* (do inglês: fator de crescimento tumoral)
MHC	Complexo de histocompatibilidade
Th	*T. helper* (do inglês: T- auxiliar)
MCP	*Monocyte chemoattractant protein* (do inglês: Proteína monocítica quimioatratíva)
ARPE	A. Epitélio pigmentado da retina
DAPI	4’6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
PBS	Tampão salina fosfatada
DMEM	*Dulbecco Medium Essetial Media*

PFA	Paraformaldeido
SFB	Soro Fetal Bovino
HBSS	*Hanks Buffer Salt Solution* (do inglês: solução salina tamponada de Hanks)
CXCL	*C-X-C Ligand* (do inglês: lingate C-X-C)
Fas/FasL	*Fas ligand* (do inglês: ligante Fas)
Gp	Glicoproteína
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
GM-CSF	*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor* (Fator colônia-estimulante de Macrófago granulocítico)
MIP	*Macrophage inflammatory protein* (do inglês: Proteína inflamatória macrofágica)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Disposição das áreas de estímulo, em uma placa de 6 *wells*, onde A: controle negativo, e B: estímulo 46

Figura 2 - Aspecto geral do evento migratório das células ARPE-19 cultivadas em membrana de *transwell*. **A** Controle, seta dupla indicando área que não contém células, em aumento de 20x. **B**. Célula ARPE-19 exposta na porção basal ao *Toxoplasma gondii* da cepa RH, por 24 horas, contorno de seta indicando regiões dos poros preenchidas por células, aumento de 20x 53

Figura 3 - Aspecto geral do evento migratório das células ARPE-19. **A** Controle, em aumento de 40x. **B**. Célula ARPE-19 exposta na porção basal ao *Toxoplasma gondii* da cepa RH por 24 horas, contorno de setas indiciam as regiões dos poros preenchidos, aumento de 40x 54

Figura 4 - Número de células ARPE-19 aderidas à porção inferior do *well*, após migração pela membrana do *insert transwell*. **A** Células do grupo controle contendo meio de cultura sem suplementação; **B.** Células ARPE-19 aderidas após exposição ao *T. gondii* da cepa RH; **C.** Células ARPE-19 após exposição ao antígeno em concentração de 0,25µg/ml de antígeno em meio de cultura DMEM. Aumento 20x 56

Figura 5 - Aspecto geral das células ARPE-19 cultivadas no *well* de ágar utilizado na técnica de *Under-agar*. **A.** densidade de 5000 células; Aumento 5x **B.** 10.000 células, aumento 10x; **C.** 25.000 células, aumento 10x; **D.** 50.000 células, aumento 10x 57

Figura 6 - Distância percorrida a partir do crescimento celular por estímulo. **A.** Estímulo negativo do grupo controle, onde o contorno de seta indica região com crescimento basal; **B.** Crescimento celular da ARPE-19 não infectada apresenta a distância deslocada (seta longa), estimulada pela presença do SFB. **C.** ARPE-19 infectada, a seta indica o crescimento celular percorrido para *well* controle; **D.** ARPE-19 infectada com *T. gondii*, onde a seta indica a distância percorrida após estímulo com SFB. Aumento 10x 58

Figura 7 - Avaliação geral do evento migratório da célula ARPE-19 exposta ao parasita, (área delimitada) demonstra a região limite da membrana, sem ultrapassagem das células **A.** Controle experimental; **B.** Estímulo com o parasita vivo. Aumento 10x 59

Figura 8 - Células ARPE-19 expostas ao parasita plaqueados em *wells* diferenciados na técnica de *under agar*, setas demonstram parasitas que migraram antes da migração das células ARPE-19, em aumento de 40x 60

Figura 9 - Células expostas ao sobrenadante obtido em cultura celular de ARPE-19 infectadas. **A.** ARPE-19 controle (seta) migração celular basal; **B.** (seta) migração celular observado por estímulo ao sobrenadante. **C.** ARPE-19 infectada com *T. gondii* (seta longa) migração celular; **D.** Célula infectada (seta) migração após estímulo do sobrenadante. Aumento 10x 61

Figura 10 - Migração celular da ARPE-19 exposta ao antígeno do *T. gondii* em proporção de 0,5µg/ml por 24 horas. **A.** Controle negativo, **B.** Estímulo com antígeno; **C.** ARPE-19 infectada, controle negativo, **D.** Estímulo com antígeno (setas), evento migratório e distância percorrida. Aumento 10x 62

Figura 11 - Migração celular da ARPE-19 exposta ao antígeno do *T. gondii* em proporção de 1µg/ml por 24 horas. **A.** Controle negativo, **B.** Estímulo com antígeno; **C.** ARPE-19 infectada, controle negativo, **D.** Estímulo com antígeno (setas), evento migratório e distância percorrida. Aumento 10x 63

Figura 12 - Migração celular da ARPE-19 exposta ao antígeno do *Toxoplasma gondii* na concentração de 2µg/ml, por 24 horas. **A.** Controle negativo, **B.** Estímulo com antígeno; **C.** ARPE-19 infectada, controle negativo, **D.** Estímulo com antígeno (setas), evento migratório e distância percorrida, (área delimitada) indica região limite do ágar. Aumento 10x 64

Figura 13 - Células isoladas do epitélio pigmentado de camundongos C57BL/J6, **A.** três dias de cultivo; **B.** 5 dias de cultivo; **C.** 7 dias de cultivo. (seta) indicando as células pigmentadas 77

Figura 14 - Posicionamento do núcleo de células ARPE-19 corados com violeta cristal 2%, **A.** Grupo controle; **B.** Grupo exposto ao parasita *T. gondii* da cepa RH. Aumento 10x 78

Figura 15 - Identificação dos poros com partes da célula EPR isoladas de camundongos C57BL/J6, onde (contorno de seta) indica partes da célula dentro do poro da membrana. **A** e **B.** (Grupo Basal) Célula isolada de camundongo C57BL/j6 saudável exposto a SFB para controle interno do experimento 80

Figura 16 - Célula isolada de camundongos C57BL/j6 controle exposto ao *T. gondii* ME-49; **A.** Célula sobre a membrana do *transwell* sobre o poro, não realizando a migração para a porção inferior. **B.** Migração lenta da célula para o interior do poro, sem adesão as paredes do poro 81

Figura 17 - **A e B** Célula isolada de camundongos C57BL/J6 imunizado (30 dias) com a cepa RH, (contorno de seta) indica célula dentro do poro 82

Figura 18 - **A e B** Célula isolada de camundongos C57BL/J6 infectados com *T. gondii* ME-49 (45 dias), onde contorno de seta indica partes da célula adentrando o poro da membrana, e seta indica porção basal da célula que ultrapassou a membrana 83

Gráfico 1 - Número de células contadas na parte inferior do *well*, representativa do número de células que destacaram da porção inferior da membrana pós migração 55

Gráfico 2 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Controle 65

Gráfico 3 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Parasita 66

Gráfico 4 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Sobrenadante 66

Gráfico 5 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 0,125µg 67

Gráfico 6 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 0,25µg 67

Gráfico 7 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 0,5µg 68

Gráfico 8 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 1µg 69

Gráfico 9 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 2µg 69

Gráfico 10 - Média do desempenho da célula ARPE-19 em relação à distância percorrida em µm, comparando a distância do estímulo, menos a distância do controle obtido nas mesmas amostras 70

Gráfico 11 - Razão do número de células contadas entre o perímetro percorrido por estímulo, e o controle negativo 71

Gráfico 12 - Número estimado de células isoladas do epitélio pigmentado da retina de animais C57BL/J6 após passagens semanais 75

Gráfico 13 - Nível de TNF-α pós desafio com *T. gondii* ME-49; onde Basal refere-se a secreção normal de TNF-α pela célula, Controle obtido de células do EPR isoladas de animais saudáveis; imunizado, células isoladas de animais imunizados com 3 doses de ME-49 irradiado a 255Gy (3.10^6 parasita/ ml). Infectado, obtido de células isoladas de animais infectados com dose única de taquizoitos de ME-49 84

Gráfico 14 - Nível de IL-10 pós desafio com *T. gondii* ME-49; onde Basal refere-se a secreção normal de IL-10 pela célula, Controle obtido de células do EPR isoladas de animais saudáveis; imunizado, células isoladas de animais imunizados com 3 doses de ME-49 irradiado a 255Gy (3.10^6 parasita/ ml). Infectado, obtido de células isoladas de animais infectados com dose única de taquizoitos de ME-49 85

Gráfico 15 - Nível de IL-6 pós desafio com *T. gondii* ME-49; onde Basal refere-se a secreção normal de IL-6 pela célula, Controle obtido de células do EPR isoladas de animais saudáveis; imunizado, células isoladas de animais imunizados com 3 doses de ME-49 irradiado a 255Gy (3.10^6 parasita/ ml). Infectado, obtido de células isoladas de animais infectados com dose única de taquizoitos de ME-49 86

Quadro 1 - *Heat Map* de citocinas dosadas em amostras de ARPE-19 saudáveis e infectadas, pela técnica de CBA®, e exibidas pelo método de análise do tamanho de efeito de cada citocina mediante exposição por parasita, sobrenadante, e antígeno obtido de parasita RH em diferentes concentrações (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2µg) 72

Quadro 2 - Apresentação das citocinas obtidas pela dosagem por CBA de amostras isoladas de RAW, ARPE-19 e ARPE-19 infectadas e suas combinações. Calculadas pelo efeito D de Cohen, gerando o quadro de *Size Effect*, Onde: <0,5 baixo; 0,5 <>0,8 médio; >0,8 alto; 0 nulo 74

Nasaré AM *Participação do epitélio pigmentado da retina na infecção pro Toxoplasma gondii in vitro* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O epitélio pigmentado da retina (EPR) é a principal estrutura celular responsável pela barreira hemato-retiniana. No entanto, em processos infecciosos, como no caso da toxoplasmose ocular, a migração do EPR ao sítio do parasita pode acabar destruindo o tecido retiniano que o cerca. A toxoplasmose é uma doença de ampla distribuição, e com muitas lacunas quanto a sua compreensão patológica em relação ao tecido ocular. Portanto, torna-se necessário mais estudos que expliquem com maior riqueza de detalhes sobre a migração deste grupo celular frente a infecção pelo *T. gondii.* Devido a isso, neste trabalho foi avaliado o mecanismo de taxia das células do EPR isoladas de camundongos C57BL/J6 imunizados e infectados em comparação a célula ARPE-19, isoladas ou associadas a RAW 264.7 expostas ao *T. gondii,* tal como as citocinas que são secretadas exclusivamente durante estas comunicações. A partir de observações microscópicas pelas técnicas de microscopia de luz, confocal e microscopia eletrônica de transmissão nos foi possível observar um aumento dos eventos migratórios das células-alvo, além da identificação de uma relação entre as interleucinas- 6 (IL-6), IL-10 e TNF-α com as diversas situações de exposição das células do EPR/ARPE-19. Por outro lado, a interação com a célula RAW264.7 foi capaz de exacerbar a resposta ao parasita e consequentemente, nos permitindo classificar um perfil inflamatório.

Palavra-chave: Toxoplasmose ocular; Epitélio pigmentado da retina; Movimento celular; Citocinas; Imunização; Toxoplasma

Nasaré AM Pa*rticipation of the retinal pigmented epithelium during the infection by Toxoplasma gondii in vitro* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

The Retinal pigmented epithelium (RPE) is the mean cell structure responsible for the blood-retinal barrier. Nonetheless, in infectious process, as in ocular toxoplasmosis, the migration of the RPE to the parasite site may destroy the adjacent retinal tissue. The toxoplasmosis is a disease with wide distribution, and with many gaps about its pathological comprehension in relation to the ocular tissue. So, it became necessary more studies that explain more detailed the migration of this cellular group over the infection by *T. gondii*. Due to this, in this work it was assessed the RPE cells taxis mechanisms isolated from immunized and infected C57BL/J6 mice in comparison with ARPE-19 cells, isolated or in association with RAW 264.7, exposed to *T. gondii*, as the cytokines that are exclusively secreted during these interactions. From microscopical analyses as the conventional, confocal, and transmission electronic microscopy, we were allowed to observe an increasement of the migratory events of the target cells, beyond the identification of a relation with the interleukins-6 (IL-6), IL-10 and TNF-α with the different situations of RPE/ARPE-19 cells expositions. In the other hand, the interaction with RAW 264.7 was able to exacerbate the response to the parasite and consequently, allowed us to classify an inflammatory profile.

Descriptors: Ocular toxoplasmosis; Retinal pigmented epithelium; Cell movement; Cytokines; Immunization; Toxoplasma

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas
Lista de Figuras
Lista de Gráficos
Lista de Quadros
Resumo
Abstract
Sumário
1. INTRODUÇÃO 25
1.1 Epidemiologia da Toxoplasmose 26
1.2 A toxoplasmose 27
1.3 Morfologia e aspectos gerais 31
1.4 Toxoplasmose Ocular 32
1.5 Epitélio pigmentado da retina 35
1.6 Retina 36
1.7 Lesões retinianas 39

2. OBJETIVOS..... 41
a. Geral 41
b. Específicos 41

3. MATERIAL E MÉTODOS 42
3.1 Modelo experimental 42
3.2 Obtenção dos parasitas 42
3.3 Preparação das soluções utilizadas 43
3.3.1 Solução Tamponada Fosfatada (PBS) 43
3.3.2 Solução *Hanks Buffer* Life Technologies ® 43
3.3.3 Preparação Solução de Paraformaldeido (PFA) 43
3.3.4 Preparo Solução de Glutaraldeido 43
3.3.5 Preparação do meio de cultivo 43
3.3.5.1 Dulbecco Modified Essential Mediuam SIGMA ® (DMEM) 43

3.3.5.2 F12 GIBCO ® 44
3.3.6 Solução de ágar para a técnica de migração *under agar* 44
3.3.7 Solução de Violeta Cristal 2% 44
3.4 Cultivo das células ARPE-19 44
3.5 Avaliação da migração celular em membrana de *Transwell* 45
3.6 Avaliação da migração das células ARPE-19 pela técnica de *under agar*..... 45
3.7 Infecção experimental das células ARPE-19 46
3.8 Desenho experimental comparativo entre as células ARPE-19 infectadas e não infectadas pelo *Toxoplasma gondii* 47
3.9 Teste comparativo dos efeitos da migração entre ARPE-19 e RAW 47
3.10 Desenho experimental e divisão dos grupos experimentais *in vivo* 48
3.11 Isolamento de células do epitélio pigmentado da retina de animais C57BL/J6 48
3.12 Cultura celular primária 48
3.13 Identificação da migração celular 49
3.13.1 Microscopia de Luz 49
3.13.2 Microscopia Confocal 50
3.13.3 Microscopia eletrônica de transmissão 50
3.14 Dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17 produzida pelas células do epitélio pigmentado da retina *in vitro* 51
3.15 Análise estatística 51

4. RESULTADOS 52
4.1 Migração celular das células ARPE-19 pela membrana de *Transwell* .. 52
4.2 Avaliação do número de células cultivadas para a técnica de *Under agar* 57
4.3 Avaliação da migração celular das células ARPE-19 pela técnica de *Under agar* 58
4.4 Análise de citocinas de células ARPE-19 mediante exposição ao *T. gondii* 65
4.5 Avaliação da migração celular comparada entre células ARPE-19 infectada e não infectada 70

4.6 Análise de citocinas das células ARPE-19 infectadas e não infectadas mediante fatores como antígenos e sobrenadante 71
4.7 Avaliação das citocinas obtidas de ARPE-19 infectadas e não infectadas associadas à célula RAW 73
4.8 Avaliação do isolamento de células do EPR de camundongos C57BL/J6 75
4.9 Isolamento de células do epitélio pigmentado da retina de animais C57BL/J6 76
4.10 Identificação da migração celular por microscopia 78
4.10.1 Microscopia Confocal 78
4.10.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão 79
4.11 Dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17 produzidas pelas células do epitélio pigmentado da retina *in vitro* de células isoladas 84

5. DISCUSSÃO 87

6. CONCLUSÃO 99
   a. Geral 99
   b. Específicas 99

REFERÊNCIAS 101
Bibliografia consultada 108

APÊNDICE A
APÊNDICE B
APÊNDICE C
ANEXO

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada por um protozoário de alta prevalência e distribuição geográfica mundial, quando levado em consideração a sorologia[1].

O *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico causador da toxoplasmose, e um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar a maior gama de animais de sangue quente, agente etiológico da toxoplasmose[2], descrito inicialmente por Splendore no Brasil, em coelhos. Simultaneamente, na Tunísia, Nicolle e Manceaux o descreveu presente nos tecidos de um roedor norte africano, conhecido como *Ctenodactylus gundii* o qual posteriormente foi utilizado para descrever o epiteto específico da espécie[3]. O gênero *Toxoplasma* utilizado para descrever o gênero, foi determinado por Nicolle e Manceaux, devido a forma arqueada do parasita[4].

Segundo Miguel *et al*.[5], o *T. gondii* apresenta três formas evolutivas infectantes, duas presentes nos hospedeiros intermediários e além destas a forma sexuada em seu hospedeiro definitivo, sendo capaz de invadir a célula hospedeira com sucesso, gerando um ambiente favorável, para conseguir seus nutrientes e evitando a destruição de suas células pela resposta imunológica do hospedeiro, respondendo a diferentes condições de estresse e modulando algumas respostas das células hospedeiras.[4,6-7]. Além destas necessidades básicas, o parasita possui organelas importantes para a invasão, como as róptrias, os mícronêmas e os grânulos densos, característicos de seu filo, Apicomplexas[4]. As róptrias são utilizadas para a realização da invasão, e recebem o auxílio de proteínas secretadas pelas micronêmas[8].

A Toxoplasmose apresenta algumas comorbidades importantes principalmente na doença congênita. A infecção materna durante o período gestacional pode causar parasitemia temporária, e danos com diferentes níveis de gravidade dependendo da cepa do parasita, grau de virulência, capacidade da resposta imune materna e o seu período gestacional[9].

Pode ser classificado em três tipos de linhagens (I, II e III), classificados quanto a sua virulência e os tipos de hospedeiro, com maior prevalência de cada tipo de linhagem em determinados hospedeiros[3]. E devido a isso, atualmente ainda

estimasse a existência de dificuldades na escolha de um marcador capaz de identificar com eficiência o parasita nos tecidos, tanto para fins diagnósticos quanto para a criação de medicamentos e vacinas específicas[10].

1.1 Epidemiologia da toxoplasmose

Atualmente estimasse que o *Toxoplama gondii* tenha infectado aproximadamente metade da população mundial [11], mas que apesar destes dados, o número de casos tem reduzido gradativamente, considerando melhorias nos fatores socioeconômicos e higiene[4].

Entretanto, a infecção congênita é observada como assintomática em 90% dos pacientes, e dentre os fetos 85% são assintomáticos[14,15]. Os dados mais atuais são de 2015, na qual 0,07 a 2,9% dos recém-nascidos foram diagnosticados com a infecção congênita [16], e dentro destes, as lesões oculares por *T. gondii* que se encontram presentes em 20% dos pacientes [17].

Por fim, estimasse que a reativação da doença ocorra em aproximadamente 30% dos pacientes imunocomprometidos [18].

Em relação as lesões oculares, segundo a classificação da cicatriz por Goldenberg *et al.*[19], esta pode ser de quatro maneiras: Atrófica, elevada, profunda, combinada (atrófica e elevada).

A lesão atrófica acomete 48% das cicatrizes, com desorganização da retina neurossensorial e afinamento; lesão elevada (23%) apesar de ser similar a atrófica, apresenta irregularidades quanto a disposição do EPR; a profunda (14%) apresenta significante atrofia da retina neurossensorial e da arquitetura retiniana, com interrupções da estrutura do EPR, enquanto a combinada 14% apresentam pontos com situações atróficas e outros pontos com a situação elevada, sempre justapostas uma à outra [19].

1.2. A toxoplasmose

A transmissão do parasita ocorre via ingestão de carne crua ou mal-cozida contaminada com cistos, ou água e alimentos crus contaminada por oocistos

presentes nas fezes de gatos [20], além disso pode ocorrer por leite infectado, acidentes mecânicos ou transplante de órgãos, porém estes métodos são muito incomuns e são definidos como transmissão horizontal [21,22].

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida complexo dividido entre sexuado, que ocorre exclusivamente no grupo dos *felídeos* e assexuado nos seus hospedeiros intermediários e definitivo. Quando os hospedeiros intermediários são infectados pelo consumo de carne contendo os cistos ou outros alimentos contendo os oocistos, também é denominado transmissão horizontal.

A transmissão também pode ocorrer de mãe para filho ainda durante a vida intrauterina, e é denominada como transmissão vertical [2]. A severidade da doença neste caso pode variar segundo a imunidade materna, o número de parasitas, a virulência da cepa e o período gestacional da infecção. Que quando adquirida do primeiro ao segundo trimestre de gestação, a infecção pode oferecer muitos riscos quando comparado ao terceiro trimestre, podendo variar de aborto e más formações até a formação de cicatriz retiniana e surdez, respectivamente [16,23]. Porém a infecção antecedente à gestação, pode acabar por prevenir o feto de contrair a doença [4,24].

Nos hospedeiros intermediários podem se estabelecer em duas formas inter-convertíveis, a qual é responsável pela forma aguda da doença em indivíduos imunocomprometidos e fetos infectados [13]. Os bradizoitos que apresentam reprodução lentificada (*bradi*= “lento” em grego), são transmissíveis e podem estar na forma encistada quando dormente; e taquizoitos (*taqui* = “rápido” em grego) que são capazes de infectar a maioria das células nucleadas rapidamente, replicar-se e romper a célula hospedeira permitindo infectar outras células vizinhas [2,5].

Ao se encistar, o *T. gondii* incorpora partes das células hospedeiras e do próprio parasita, conferindo ao parasita segurança. Uma vez que o hospedeiro não consegue identificar a estrutura estranha. Esta forma pode manter-se por meses ou anos sem despertar o sistema inflamatório e é muito comum em esporozoitas [25]. O rompimento pode ocorrer periodicamente devido à curtos períodos de estresse com depleção metabólica [2], liberando estes bradizoitos, que se transformam rapidamente em taquizoitos, aumentando o metabolismo do parasita e a infectividade [25].

O cisto após ser ingerido é rompido dentro do estomago do hospedeiro ao entrar em contato com os sucos gástricos, liberando a forma bradizoito, que é

resistente a enzima peptidase. Primeiramente o parasita se prende a parede celular do hospedeiro fracamente, por interações com as proteínas de ligação SAG, SRS e SUSA, infectando assim qualquer tipo celular nucleado. Após a adesão um sinal desconhecido descarrega um aumento no cálcio citosolico estimulando as micronemas do parasita. Então, o parasita se utiliza de seu movimento de "*gliding*" pelo movimentos das actomiosinas realizando a invasão da célula, seguido de uma secreção de quatro proteinas (RON2, 4, 5 e 8), alguns achados sugerem que um destes chegue até o citoplasma do hospedeiro expondo-se, mas o processo pelo qual o parasita se livra do sistema endolisossomal é desconhecido [2].

Com isso apesar de se conhecer o mecanismo de invasão do parasita, é preciso conhecer os mecanismo de interação do tipo celular hospedeiro. Em seguida, o *T. gondii* acaba invadindo a parede do intestino e realiza rapidamente a conversão para a forma taquizoito [2]. Estudos anteriores, revelam que o taquizoito pode ser capaz de comunicar-se com as células da barreira do epitélio intestinal sem rompê-las, além de identificar monócitos responsáveis pelo carregamento dos taquizoitos pela corrente sanguínea, levando até aos sítios imunoprivilegiados [26].

Ao ultrapassar esta barreira o *T. gondii* se replica rapidamente, e acaba por infectar células dendríticas e células monocíticas localizadas na lâmina própria, disparando uma resposta imune [27]. A resposta imune do hospedeiro rapidamente dá conta da grande maioria dos parasitas. Mas alguns sobreviventes, ao escapar, convertem-se novamente para a forma de bradizoito. Uma vez dentro do hospedeiro, o parasita é capaz de modular as células hospedadas, como bloquear o desenvolvimento de inflamações alérgicas, diminuir os níveis de respostas Th2 [28], modular a capacidade proliferativa da célula e de apoptose, em alguns casos mantendo as células em etapa de G2/M, porém quando esta manipulação se torna inviável, o parasita realiza outras conversões [29,30], atuando de forma crônica, e por vezes escapando do sistema imune, bem como de drogas que atuem contra o *Toxoplasma gondi i*[2]. Já na ausência de resposta imune, os parasitas na forma de taquizoito crescem descontroladamente causando destruição tecidual local [2].

A resposta imune é mediada principalmente por macrófagos, neutrófilos, dentre outra células do sistema imunológico, os macrófagos podem funcionar como células reguladoras afetando diversos parâmetros via secreção de citocinas relevantes à produção metabólica sobre condições de normalidade ou doenças [31]. E são essenciais

para o sucesso numa infecção pelo *T. gondii*. Na fase aguda, os antígenos são processados pelas células apresentadoras de antígeno de MHC II, estimulando a secreção de IFN-γ e IL-12, em via disso acaba pela produção de TNF-α e resposta da cadeia do oxido nítrico [6]. E por isso, o *T. gondii* acaba por induzir mudanças na resposta imunológica tanto inata quanto adaptativa [6, 17].

Diferentes peptídeos obtidos de cepas virulentas e não virulentas apresentam respostas linfocitárias discrepantes em diferentes grupos (toxoplasmose ocular, congênita, crônica e outros) [6]. Também há relatos de que as vesículas extracelulares do soro de pacientes crônicos e murinos são diferentes, e sugere que a diferença de cepas pode levar também a um evento de formação de diferentes epítopos. Além disso, ocorre o estímulo à produção de fatores de crescimento como VEGF, IGF1 e TSP1 promovendo a proliferação celular local, o que provem nutriente para a replicação do parasita, o que é vantajoso ao parasita [7].

Atualmente são descritos três diferentes tipos de linhagens clonais, que diferem tal como a virulência, a persistência, a capacidade migratória, a atração de diferentes tipos celulares e a indução de expressão de citocinas [32]. O tipo I é muito virulento, em relação ao tipo II e III. Em humanos as três linhagens causam a doença, mas aparentam afetar os tecidos de maneira diferente, tal como a I associada a doença ocular adquirida; enquanto a tipo II é mais associada as encefalites e infecções congênitas. Afetando também em questão gênica diferentemente [32]. Apesar das cepas tipo II e III serem avirulentas, o cruzamento destas aumentou a virulência de variações obtidas [2].

Quando em caráter imunológico a resposta ao parasita pode ocorrer em dois momentos distintos, após a infecção aguda ou inicial e durante a reativação das infecções pelos cistos. Por fim, havendo a liberação de interleucina (IL)-12 pelas células dendríticas, macrófagos e neutrófilos estimulando a produção de interferon (IFN)-γ pelas células T e *Natural Killer* (NK). Consequentemente disparando as cascatas de TLR e CCR5, que por sua vez são mediados pela MyD88 essencial a sobrevida do parasita. Esta proteína acaba por interagir com os receptores para IL-1 e IL-18 que regulam o nível da infecção [2]. Esta comunicação por citocinas e quimiocinas entre as células de defesa e o *T. gondii* está por ocorrer desde muito antes da infecção ser determinante [27].

Quando observado os linfócitos intraepiteliais também podem produzir IL-10 modulando a cascata a partir da sinalização de STAT3. Neste caso, as IL-6 e IL-1 são as citocinas que se mostram mais presentes na resposta imune contra o *T. gondii*, porém estudos que relacionam as lesões oculares com a toxoplasmose demonstram que os níveis de interleucinas que se mostram em alta, são as IL-1 e TNF-α [32].

Buzoni-Gatel e Werts [27], em trabalho que utilizou modelo animal, evidenciou que os níveis de IL-1A são reduzidos, com aumento nos níveis de TNF-α, em níveis de RNAm. Já estudos *in vitro* com monócitos humanos infectados demonstram altos níveis de IL-1β [32].

Esses estudos concluíram que o excesso de IFN-γ pode acarretar inflamações agudas, infiltrados, hemorragia e perda de células da barreira epitelial [27]. Já que esta citocina é uma molécula efetora linfocitária de origem autoimune responsável na ativação macrofágica e no recrutamento de células inflamatórias [33]. Além disso, nesta comunicação a modulação do parasita do tipo I pode envolver o bloqueio da ação do NF-κβ inibindo a ação inflamatória em nível gênico do TNF-α e da IL-12p40 [2].

Os tipos I e III apresentam similaridades na proteína ROP16, que só é secretada durante o processo de invasão. Assim sendo, a ROP16 está diretamente envolvida na ativação da cadeia STAT3/6 [32].

Apesar destas interações os taquizoitos podem agir diretamente na expressão gênica, suprimindo os responsáveis pela codificação de IL-12 e TNF-α, que sofrem uma diminuição em particular. Para facilitar a disseminação do parasita também já descrita, na qual a sua ação sobre genes responsáveis pelo CCR7 e IL-10 aumentam [27].

Esta forma de defesa também pode ser vista durante a infecção primaria em gestantes, na qual a resposta Th2 modula os níveis de IL-4 e IL-10, controlando os níveis de IFN-γ, uma vez que o seu excesso possa acarretar a morte celular por reação imunopatogênica excessiva [23].

1.3. Morfologia e aspectos gerais

Pertencente ao filo apicomplexa, o *Toxoplasma gondii* se apresenta com uma estrutura celular polarizada e duas organelas apicais secretoras denominadas micronemas e roptrias [2,34].

O parasita apresenta movimentos variáveis dependendo a circunstância em que encontra as estruturas intracelulares e microtubulares, o organismo é capaz de torcer, zigzaguear, rodar e deslizar, além de um movimento lento, espiralado e ondulado.

O movimento da conoide é independente, mas é capaz de estender, retrair, lançar ou rodar. Quando uma célula hospedeira é encontrada, o conoide se estende até a superfície da célula e avança causando a ruptura da membrana celular por força mecânica, liberando enzimas líticas pelas roptrias. A invasão leva cerca de 30 segundos. E a sua entrada é crucial para a sobrevivência do organismo. O conoide apresenta três anéis: pré conoidal posterior e anterior e o conóide polar. Estes anéis apresentam elementos que podem interferir na função dos microfilamentos que por sua vez podem interferir na penetração da célula hospedeira, pelo próprio hospedeiro [21].

Na atualidade, não existe vacina de uso comercial para a toxoplasmose. Apesar de a TOXOVAX® ser utilizada na Nova Zelândia para a imunização de gado, a sua efetividade é em torno de 70%. Pois a imunização de organismos hospedeiros para patógenos eucarióticos é muito mais difícil quando comparada a agentes virais, justificando a ineficácias das tentativas vacinais para o *T. gondii* [35].

Nesse sentido, a busca de uma vacina eficiente, amplia o campo da pesquisa desde o uso de proteínas a técnicas de imunização gênica [20].

Uma maneira de imunização é pela irradiação com Cobalto 60. Que consiste na morte mitótica pela quebra da dupla fita de DNA e indução da apoptose dos linfócitos, devido ao efeito direto nas membranas celulares por produção de radicais livres [20].

Nestes estudos conduzidos por Hiramoto *et al.*[20], geralmente são avaliados os efeitos sobre as células hospedeiras, mas em análises do parasita percebeu-se que a

irradiação era capaz de afetar a reprodução, mas não a estrutura do parasita, tornando assim um excelente modelo para exemplares vacinais.

A eficácia é mantida, pois a invasão dos parasitas permanece com consequente degeneração após a invasão, funcionando como um “apresentador” dos antígenos, estimulando o sistema imune [20,35].

Na toxoplasmose, a resposta imune é mediada pelas CD4+, CD8+ e Células B e T [35] o que garante a resposta imune a longo prazo. Desta maneira, apesar do esforço científico, não há nenhuma vacina comercial para uso em humanos e animais [36].

1.4 Toxoplasmose Ocular

A encefalite e a retinocoroidite são as resultantes mais frequentes das complicações causadas pela toxoplasmose, mas a uveite é a manifestação mais comum, variando entre 10 e 50% dependendo da região geográfica [37,38].

A grande maioria dos casos de toxoplasmose ocular são resultados da infecção congênita. O primeiro alvo da toxoplasmose na estrutura ocular é a retina neural, onde o parasita forma seus cistos. No entanto, também pode apresentar taquizoitos livres e cistos no epitélio pigmentado da retina (EPR). A toxoplasmose ocular envolve necrose da retina neural, do EPR, e da área subretiniana, além de neovascularização e inflamação local. O processo inflamatório acaba por danificar a membrana de Brüch, ocasionando descolamento da interface coroide-retiniana [37,38].

Os sintomas mais comuns da toxoplasmose ocular são visão embaçada e decaimento da acuidade visual, porém dor ocular, moscas volantes e fotofobia podem estar presentes [38]. Além de mudanças no padrão de pigmentação da retina indicando o envolvimento do EPR [7].

O método de invasão da estrutura ocular, ocorre após a invasão do *T. gondii* no organismo, que ao invadir os macrófagos e neutrófilos é conduzido até a estrutura ocular, via corrente sanguínea. A partir de então acessa a retina pela circulação coroidal ou retiniana, determinando assim o sítio de infecção (retina interna e retina externa) [25,26,39,40].

A sua forma aguda, comumente aparece na forma de retinocoroidite necrosante, com inflamação difusa na retina e corióide, com aumento gradativo da

carga parasitaria na retina, diferente da corióide, que se mantem sempre baixa, contradizendo assim os descritos a respeito da ordem de envolvimento dos tecidos na qual se tinha como visão de que a corióide era atingida em segundo momento. Indicando, portanto, uma replicação e uma transmigração do parasita neste tecido [39].

Na infecção ocular os neutrófilos são como o pilar central da resposta imune inata e os mais prevalentes. Os neutrófilos infectados promovem uma resposta imune local, liberando citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) na porção posterior do olho, tornando o epitélio pigmentado da retina a chave central e alvo para o *T. gondii* [39]. Os CD4+ T *helpe*r específicos aumentam com a finalidade de apresentar um papel central na patogenia da uveite, regulando a resposta imune orquestrando as demais células [41].

As citocinas apresentam papel importante no controle da doença ocular, e o IFN-γ é uma das citocinas com maior responsabilidade na resposta imune adaptativa, produzida pelas células T. O TNF-α também tem sua importância considerada na resposta imune inata em qualquer situação infecciosa. Tal como a sinergia entre estas duas citocinas e suas atividades individuais na inibição do parasita [25]. Muitos estudos detalham o papel das citocinas na regulação do parasita em diferentes modelos animais. Como o IFN-γ podendo promover uma proteção completa contra infecções pelas cepas C56 em modelos animais como o Swiss e o Balb/C, mas com mortalidade de 100% em camundongos C57Bl/6. Uma vez que o IFN-γ é capaz de inibir a replicação do parasita, este fenômeno aparenta ser célula-dependente, ou seja o mediador secretor é específico de um determinado grupo de células [37,40]. Por outro lado, algumas citocinas são imprescindíveis para o controle ou bloqueio da resposta protetiva contra o *T. gondii* [18].

A IL-6 é uma molécula pró inflamatória multifuncional responsável por regular a resposta imune, ativando células imunológicas especificas, amplificando outras respostas que também está aumentada durante a infecção, inibindo a distorção do tecido retiniano, além de induzir uma diminuição na concentração de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em modelos animais [42].

Ela faz parte de um grupo de interleucinas que mediam a resposta inflamatória e pode ser expressa de diversas maneiras diferentes considerando todas as formas de exposição ao qual o tecido esteja submetido [42]. Mas diferentemente do IFN-γ e do TNF-α, a IL-6 não interfere diretamente na replicação do parasita, porém com grande

potencial quando relacionado a macrófagos, fibroblastos e monócitos associando-se ao IFN-γ [37].

Apesar de todos os estudos relacionando estas citocinas a patologia ocular, poucos apresentam uma informação clara a respeito destes quanto à evolução da doença. Bem como a avaliação de IFN-γ no soro e no humor aquoso que apresentam diferenças grandes no quesito escala de expressão, mas com estreita ligação com diferentes sinais clínicos [37].

A IL-6 também é responsável por regular a IL-17A, que tem como principal finalidade a mediação da produção de CD4+, quando associado a patologias com resistência múltipla [43].

A IL-10, TGFβ1 e o IFN-γ disparam diferentes sinais intracelulares, IL-10 e IFN-γ se conectam aos receptores da membrana plasmática; promovendo respostas anti-inflamatória e pró inflamatória, respectivamente. Podendo haver altos níveis de IL-6 e IL-17A, sem mudanças nos níveis de TNF-α ou IL-10 [44], mas também com grande variação de expressão nas mais diversas situações [37].

As IL-2 e IL-4 dificilmente se mostram em condições experimentais pois conforme descrito por Barbosa *et al*. [44], a IL-10 apresentam uma resposta muito mais efetiva, seja em estudos de teste para infectividade do *T. gondii*, quanto na regulação de IL-6 e TNF-α.

Em humanos saudáveis geralmente a toxoplasmose é benigna com poucos sintomas, mas pode levar à toxoplasmose ocular [20] que é parte causada devido a lise das células da retina infectada e parte devido a resposta inflamatória da coroide [25].

A retina, os neurônios, e as fibras musculares são os principais alvos, sintomáticos quando o tecido se torna inflamado [40]. O primeiro reconhecimento é pelas células dendríticas e fagócitos mononucleares que liberam IL-12 e TNF-α. Este último liberado exclusivamente pelas células dendríticas, que por sua vez estimula as células NK, as CD4 e as células CD8 a secretarem IFN-γ. Sendo o principal fator de resposta mediada no caso de infecções por *T. gondii*, que por fim, pode ser controlado pelos níveis de IL-10 [40].

A resposta tardia é responsável pela eliminação de células infectadas via produção de citocinas e a ação dos linfócitos CD8 já previamente ativados (CD8+), ou pelas células NK pela produção de IFN-γ. A imunidade não eficiente pode resultar em uma ausência de resposta ou exacerbação desta [20].

Com a ruptura do cisto, tanto viáveis quanto não viáveis há a liberação dos parasitas nos tecidos adjacentes, causando a retinocoroidite de repetição [21]. Devido a isso, a patogenia do processo inflamatório na toxoplasmose ocular ainda continua obscura, apesar de saber do envolvimento de diversas citocinas [45], os tipos celulares nos quais os parasitas se desenvolvem não são bem claras, mas é sabido que geralmente estão próximas a célula de Müller.

As células de Müller suportam as células da glia que estão espalhadas por toda a camada da retina, estas células podem apresentar antígenos, e expressão de MHC tipo II [25]. A maioria dos antígenos são secretores ou excretores, e após o processo de ultracentrifugação é denominado extra-vesícula. Estas extra-vesículas são importantes para a replicação do parasita, pois torna o processo rápido, dinâmico e efetivo, estando presente tanto nos taquizoitos, quanto bradizoitos [6].

1.5 Epitélio pigmentado da retina

A camada mais externa da retina é denominada Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) e apresenta papeis importantes na sua fisiologia, tal como transporte de nutrientes oriundos da porção vascular corióidea, a formação da barreira hemato-retiniana e absorção de luz excessiva, além de realizar a fagocitose de discos membranosos liberados pelos fotorreceptores [9].

O EPR é uma monocamada formada por células pigmentadas, basolateral face à membrana de Brüch, encarregada de absorver a luz focada pela lente, carreadora de íons, água e metabólitos [46], na sua porção apical apresenta microvilosidades [47]. Com numerosas mitocôndrias em seu citoplasma, e grânulos de melanina que lhe conferem a cor castanha e lisossomos que auxiliam na rápida despolarização, de modo que também realize digestão de maneira reciclatória dos componentes dos fotorreceptores. A autofagia está relacionada a mecanismos de imunidade adaptativa e inata do bulbo do olho, e minimiza os danos na estrutura ocular [48].

Dentre suas funções apresenta a característica principal de barreira hemato retiniana [49], sendo apenas uma dentre as quais protege o sistema ocular, em conjunto a barreira hemato-aquosa. A justaposição das células do EPR é denominada *tigh junctions*, e tem como finalidade estabilizar a barreira hemato-retiniana [26].

Associado a esta barreira há a presença de astrócitos, que mantêm a integridade dos vasos sanguíneos retinianos, e pericitos responsáveis pelo tônus vascular. A permeabilidade das *tigh junctions* afetada pela presença de células inflamatórias pode ter grande influência na quebra desta barreira fisiológica [9, 50]. As *tigh junctions* restringem eficientemente a permeação paracelular da retina e a sua destruição pode ocasionar aumento da permeabilidade e disfunção homeostática, levando a perda de visão.

O epitélio pigmentado da retina apresenta dentre todas suas funções a capacidade de migrar até o sítio de infecção e realizar a fagocitose [47,51], e controle por supressão do acúmulo de linfócitos. Além de seu importante papel na inflamação de doenças infecciosas do polo posterior, secretando IL-6, IL-8, moléculas de adesão intercelular -1, e óxido nítrico, hiper-regulação da expressão de proteínas de superfície do MHC I e II, e sua participação na apresentação de antígeno e imunorregulação [52].

1.6 Retina

A retina é uma estrutura complexa, tanto em arquitetura quanto antigenicidade. Composta por dez camadas localizada na porção posterior do bulbo do olho; sendo a camada mais externa do bulbo o epitélio pigmentado da retina, que é responsável pela adesão a corióide, e aos fotorreceptores. Esta complexidade se dá desde o seu desenvolvimento do tubo neural até o compartilhamento de origem estrutural com o sistema nervoso central [45].

Devido ao seu posicionamento, este grupo celular apresenta em sua composição muitos lisossomos que auxiliam na digestão e reciclagem de células dos fotorreceptores. Os fotorreceptores, é um grupo celular dividido em dois tipos, cones e bastonetes, nos quais os cones são responsáveis pelo espectro claro e escuro, enquanto os bastonetes fazem as misturas de cores entre vermelho, azul e verde [46].

Os fotorreceptores, como o próprio nome diz, fazem a captação da luz e a partir da conversão entre *cis* e *trans* do retinol, as imagens captadas são convertidas de estímulo luminoso para estímulo químico e direcionadas para o grupo de células presentes na camada nuclear externa, composta pelas células de Müller e células horizontais, passando por uma região sináptica denominada região plexiforme externa [46].

Esta camada consiste em células alongadas chamadas de células bipolares; seguida pela camada nuclear externa o estímulo é direcionado para a camada nuclear interna, composta por células amácrimas que estabelece contato com a camada ganglionar pela camada plexiforme interna. Nos gânglios é onde há o acúmulo do estímulo que será direcionado pelas fibras ganglionares rumo à um único ponto que será determinado nervo óptico, e este responsável por dar sequência no caminho da "imagem" agora em formato químico para o sistema nervoso central, fazendo a formação da imagem [46].

A barreira hemato retiniana pode ser dividida entre interna e externa, na qual a interna é composta pelas zonulas ocludentes, mais comumente conhecida como *tigh junctions* localizada entre as células endoteliais, que são responsáveis pela polarização da barreira, sua estrutura é coberta por astrócitos que estão intimamente ligados aos vasos sanguíneos, realizando a manutenção da integridade tecidual, melhorando o potencial da barreira do endotélio retiniano, células de Müller, e alguns pericitos presos a lâmina basal, regulando o microambiente, e a tonicidade vascular, pela secreção de material extracelular [53].

Esta estrutura tem como papel fundamental a preservação e manutenção do ambiente propicio para uma função visual ótima, tanto fisiológico quanto celular, e pode ser didaticamente dividida em duas partes, barreira hemato-aquosa e a retiniana propriamente dita, mantendo o olho como um sítio imunologicamente privilegiado. Já a porção externa regula o acesso de nutrientes do sangue para os fotorreceptores, além de descartar os metabólitos, e manter as características fundamentais para tal funcionamento [53]. Esta camada também serve como rota de drenagem para os metabólitos do tecido ocular. A partir do momento que esta barreira não é mais um impeditivo, é importante saber que não existe uma segunda barreira que realiza esta função [53] dando livre acesso aos agentes patogênicos.

Já a produção de citocinas por células mononucleares proliferativas não apresenta padrão específico. Apresentando apenas relação com IL-4 e IL-5. A IL-17A media o desenvolvimento da resposta autoimune nos casos de encefalite toxoplasmica, e é contrabalanceada pela IL-27 [45].

Estudos utilizando células demonstram que o perfil Th17 atua na redução de danos teciduais com indução destas citocinas via IL-6 e TGF-β. Pois a IL-17A é capaz

de induzir a separação das *tight junctions* do tecido endotelial responsáveis pela barreira hemato-encefálica, de modo que assim os linfócitos são capazes de atravessar o endotélio vascular [45].

A destruição do tecido corioideo-retiniano pode ocorrer mediante invasão por diversos agentes infecciosos, o grau da destruição depende segundo o tecido envolvido, as características biológicas do organismo patógeno e a sua interação. Já o *T. gondii* leva a um quadro de retinite necrosante, afetando diretamente a coroide que acaba sofrendo com o processo inflamatório [21].

A adesão leucocitária e a quebra da barreira hemato retiniana pode ser mediada via cadeia do óxido nítrico, que promove a diminuição da expressão das proteínas de *tight junctions* [53].

A autofagia é um processo responsável pela defesa a partir da transferência de componentes intracelulares, como proteínas defeituosas, organelas e proteínas virais para o vacúolo lítico para degradação, tal como para a manutenção do *pool* aminoácido, prevenindo neurodegradação, supressão tumoral e regulação da imunidade inata e adaptativa, sendo um processo basal, principalmente no EPR [54].

A prática de xenofagia, que envolve o reconhecimento de um patógeno intracelular e criação de um alvo deste patógeno para iniciar o maquinário de autofagia ocorre independente de a célula estar infectada ou não, como nos experimentos de Williams *et al*. [54] com o uso do vírus da rubéola. Mas este evento é dependente do período o qual a infecção possa ocorrer resultando em um acúmulo de autofagossomas [55].

Este fenômeno também pode ser controlado pela replicação no caso de vírus que ao aumentarem e egressarem da célula acabam por inibir a degradação do autolisossomo. Ou seja, dependendo da necessidade do parasita há uma interação diferenciada com a célula responsável pela sua destruição [55]. E em virtude destas diferenças em relação a um único tipo celular, a indução da resposta imunológica mediada de maneira protetiva contra o *T. gondii* é um dos desafios mais acentuados atualmente, ressaltando a necessidade de vacinas com o parasita atenuado ou vacinas de DNA [13].

1.7 Lesões retinianas

A retinocoroidite pode ser adquirida ou congênita, se manifestando na forma de uma lesão focal pequena e periférica ou de um granuloma fulminante com necrose na retina e corióide. Há tempos discutia-se a probabilidade de bilateralidade quando congênita e unilateral quando adquirida [21], mas atualmente sabemos que não se tem evidências suficientes para esta afirmação.

Quando o parasita alcança o olho, uma reação inflamatória ocorre, progredindo para a retinite e com envolvimento da coroide secundariamente [56].

As lesões oculares causadas pelo *T. gondii* são detectadas na presença do cisto tecidual e possivelmente alguns parasitas livres nos vasos retinianos, podendo estar associado à presença de infiltrado inflamatório perivascular mononuclear, normalmente necróticas, com alteração da arquitetura ocular, afetando principalmente a retina neural e coroide. Estudos sugerem que a lesão é resultante de uma inflamação causada por células mononucleares no sítio de inflamação [26,57].

Mas é sabido que os danos causados na retina são multifatoriais, e variam segundo a cepa [55], a virulência do parasita e a força de resposta imunológica do hospedeiro que pode variar também segundo os antígenos pré-existentes na resposta humoral [45], resultando no quadro de gravidade final [58].

Porém, normalmente uma lesão ativa é encontrada na forma de ponto focal amarelo-esbranquiçado sobrepondo um vítreo acastanhado, comumente acompanhado por uma inflamação severa do vítreo. A inflamação ativa pode durar por cerca de 6 semanas, com posterior regressão e formação de cicatriz [7,19].

As lesões recorrentes, tendem a aparecer nas bordas das cicatrizes. Outras complicações da apresentação atípica são as formas mais agressivas de retinocoroidite, a neuroretinite, a toxoplasmose retiniana externa putativa, a vasculite retiniana oclusiva, a neovascularização retiniana e subretiniana, o descolamento de retina seroso e regmatogênico, a retinopatia pigmentosa, dentre outras patologias do nervo óptico. Goldenberg *et al*. [19] descreve em seus estudos a caracterização por imagem dos artefatos causados pelo *Toxoplasma gondii* à retina por imagens tomográficas computadorizadas, e relatou também o afinamento da corióide, principalmente durante a fase aguda da doença.

No geral as lesões podem ser múltiplas ou isoladas. Quando inativa, os sintomas podem ocorrer de forma imprevisível, ou até mesmo nunca afetar a vida do hospedeiro. Tais lesões podem se dar de maneiras diferentes, podendo ser uma lesão

focal única resultante da necrose retiniana ou acompanhada de cicatrizes antigas de picos agudos anteriores; ou pontual envolvendo o EPR com lesões satélites [21].

Em resumo, a doença se mostra comumente como uma retinite necrosante, com difusão para regiões adjacentes, podendo causar a uveite anterior, com extensiva destruição do tecido retiniano, e destruição do epitélio pigmentado da retina. O tecido ocular pode apresentar um infiltrado importante de linfócitos T e B, células do plasma, neutrófilos, eosinófilos e células fagocíticas mononucleares [39].

Para Lie *et al*., [7] lesões retinianas com pigmentação, e uma perda central já são achados clínicos suficientes para classificação como lesões retinianas de origem toxoplasmica [7]. E as vitrites se dão geralmente associada a casos de infecção via circulação da retina acumulando células inflamatórias no humor vítreo, podendo desencadear uma neovascularização. Em pacientes imunologicamente deficientes, a lesão geralmente se apresenta de forma múltipla e ativa nos casos de retinocoroidites antigas, com evidências de células inflamatórias no vítreo [21].

Diversas células do EPR depositadas sobre a membrana de Brüch são responsáveis por manter a homeostase, porém quando desregulado tende a favorecer a partir da produção de citocinas situações pró-inflamatórias que podem afetar o microambiente, tais como VEGF, IL-6 IL-8 e MCP-1 [42].

Vale ressaltar que fatores externos como idade, gênero, fumo, problemas cardiovasculares, características da íris e até mesmo níveis internos de antioxidantes afetam os resultados obtidos nos levantamentos de dados relacionados a doenças oculares [42].

Nesse contexto e interação entre patógeno, sistema imune e hospedeiro se faz importante o estudo do desenvolvimento da doença em todos os seus aspectos, desde as condições teciduais, até os níveis moleculares. E apesar de termos descrito na literatura diversos eventos quanto a invasão pelo *Toxoplasma gondii*, pouco se tem a despeito da função real EPR quanto a invasão por este parasita e a sua comunicação.

Por fim, identificar quais indicadores fazem parte desse processo patológico, seria de fundamental importância para a resolução da infecção pelo *T. gondii*, nos permitiria evitar que o parasita destrua o tecido, ou que a resposta imunológica o faça deliberadamente. Entendendo a cascata inflamatória e possibilitando novas perspectivas no tratamento da doença.

2 OBJETIVOS

a. Geral

Identificar a migração das células do epitélio pigmentado da retina mediante presença do *Toxoplasma gondii* ou antígeno.

b. Específicos

Examinar a migração de células do epitélio pigmentado da retina extraída de animais C57BL/6 expostas ao *T. gondii*.

Examinar a migração de células ARPE-19 expostas ao *T. gondii*.

Localizar as citocinas responsáveis pela comunicação celular entre as células ARPE-19 e o parasita *T. gondii*.

Localizar as citocinas responsáveis pela comunicação celular entre as células do EPR isoladas de camundongos C57BL/j6 e o parasita *T. gondii*.

Reafirmar a presença de citocinas das células ARPE-19 quando associadas a um diferente grupo celular, exposta ao *T. gondii*.

Esclarecer possíveis alterações nos padrões de citocinas expressas pela célula ARPE-19 quando infectadas com o *T. gondii*, e expostas ao parasita.

Discutir possíveis alterações na capacidade da célula ARPE-19 saudável ou infectada de identificar a presença do parasita e realizar a migração.

Comparar a eficiência da sinalização do antígeno isolado em diferentes concentrações, sobrenadante de cultura ARPE-19 infectada com *T. gondii*, e o parasita *T. gondii*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Para os experimentos foram utilizados 20 camundongos machos C57BL/J6 (isogênicos) de 8 semanas, adquiridos no Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada, recebendo ração comercial Nuvital® e água *ad libitum*.

Todos os animais utilizados foram eutanasiados após 45 dias, em câmara de CO_2 e a manipulação destes foi conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório e com os "Princípios de ética em experimentação animal" (SBCAL/COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Este trabalho foi submetido e recebeu aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEUA/IMTSP), registrada com o nº 000349-A.

3.2 Obtenção dos parasitas

Os taquizoitos foram obtidos da biblioteca criopreservada do laboratório de protozoologia do Instituto de Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina/USP (IMT-FMUSP).

Os cistos foram obtidos de animais previamente infectados, a partir do cérebro macerado mecanicamente a 4ºC, após a fragmentação foi realizada a lavagem do tecido com Solução Tampão Fosfatada (PBS), e realizada diversas passagens com a seringa de calibre (23G). O número de cistos foi contado e a quantidade de 10 cistos por animal foram inoculados por via oral por gavagem. A viabilidade dos parasitas foi avaliada a partir de corante vital Tripan Blue®.

3.3 Preparação das soluções utilizadas

3.3.1 Solução Tamponada Fosfatada (PBS)

Para o preparo do PBS foi utilizado 8g de cloreto de sódio (NaCl), 0,2g de cloreto de potássio (KCl), 0,2g de fosfato di-hidrogênio de potássio (KH_2PO_4) e 2,16g de fosfato de hidrogênio de di-sódio (Na_2HPO_4), e após a completa diluição dos solutos, teve o pH corrigido para 7,4, completando o volume da solução para 1 litro, e autoclavada.

3.3.2 Solução *Hanks Buffer* Life Technologies®

Para o preparo da solução tamponada de *Hanks* (GIBCO, 11201-019) foi diluído 0,37g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o pH corrigido para 7,2, completado para 500ml e filtrado com auxílio de membrana com porosidade 0,22µm (Sarstedt®).

3.3.3 Preparação Solução de Paraformaldeido (PFA)

Foi diluído 4g de PFA ($OH(CH_2O)$ em PBS, aquecendo constantemente até a temperatura de 60ºC. E hidróxido de sódio (NaOH) até que a solução se tornasse límpida. Por fim o pH foi corrigido para 7,4, e o volume corrigido para 100ml.

3.3.4 Preparo Solução de Glutaraldeido

O glutaraldeido ($C_5H_8O_2$) (Sigma®) concentrado a 25% foi diluído em tampão Cacodilato 1M, em quantidade suficiente para (q.s.p) 2,5%, para uso imediato, conforme instruções do fabricante.

3.3.5 Preparação do meio de cultivo

3.3.5.1 Dulbecco Modified Essential Medium SIGMA® (DMEM)

Para o prepare do meio de cultura DMEM (SIGMA, D-6655), foi acrescido a solução 3,7g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o pH corrigido para 7,2, e a solução completada com água mili-Q para um litro.

3.3.5.2 F12 GIBCO®

Para o preparo do suplemento F-12 (GIBCO, 21700-026), foi acrescido à solução 3,7g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o pH corrigido para 7,2, e a solução completada com água mili-Q para um litro.

3.3.6 Solução de Ágar para a técnica de migração *under agar*

Para o preparo da placa de agarose, seguiu-se o protocolo proposto por Heit e Kubes [59], onde inicialmente foi pesado 0,48g de ágar ($C_{14}H_{24}O_9$)(#161-3102, Bio-Rad©). diluído em 10ml de água destilada, e autoclavada. Em paralelo foi preparado uma solução contendo 10ml de *Hanks Buffer Salt Solution* (HBSS) 2 vezes concentrado e 20ml de meio de cultura suplementado com 10% de SFB (DMEM/F12 v:v). Para o preparo da placa a solução contendo o HBSS2x/ meio de cultura foi aquecido à 68ºC, e a agarose fundida em micro-ondas. As duas soluções foram misturadas com auxílio de vórtex por 30 segundos. Desta mistura foram coletadas 8ml e depositada em placa de cultura de 6 *wells* (Corning®) cuidadosamente, evitando o surgimento de bolhas. Foi aguardado a solidificação da agarose, e as placas foram trepanadas em três regiões paralelas com um trépano de 8mm, e acondicionadas em estufa de cultura a 37ºC, com umidade e 5% de CO_2 por 1 hora. Em seguida com uma ponteira foi removida o excesso de água liberado do acondicionamento e as células ARPE-19 plaqueadas no *well* central. Os outros dois orifícios foram preenchidos com meio de cultura por 24 horas até a aderência completa das células

3.3.7 Solução de Violeta Cristal 2%

Para o preparo da solução de Violeta Cristal foi pesado 0,20g da solução em pó de Violeta Cristal (1408, Merck®), e diluído em uma solução contendo 20ml de metanol absoluto (Synth®) e 80ml de água destilada.

3.4. Cultivo das células ARPE-19

As células foram obtidas com um de nossos colaboradores, Centro Avançado de Superfície Ocular, da UNIFESP e incubadas em estufa para cultivo celular com 5% de CO_2 a 37°C, seguindo troca de meio de cultura em dias alternados. Após a

confluência, as amostras foram tripsinizadas com solução de ATV (Tripsina 0,2% e Versene 0,02%) fornecidas pelo Instituto Adolf-Lütz filtrado em membrana 22µm (Instituto Adolfo Lutz) e contadas em câmara de Newbauer.

As células foram cultivadas por aproximadamente sete dias utilizando meio DMEM/ F12 (v:v), suplementado com 10% de SFB e 1% de glutamina, até o alcance de sua confluência; seguindo para o plaqueamento, em *insert transwell* Corning®.

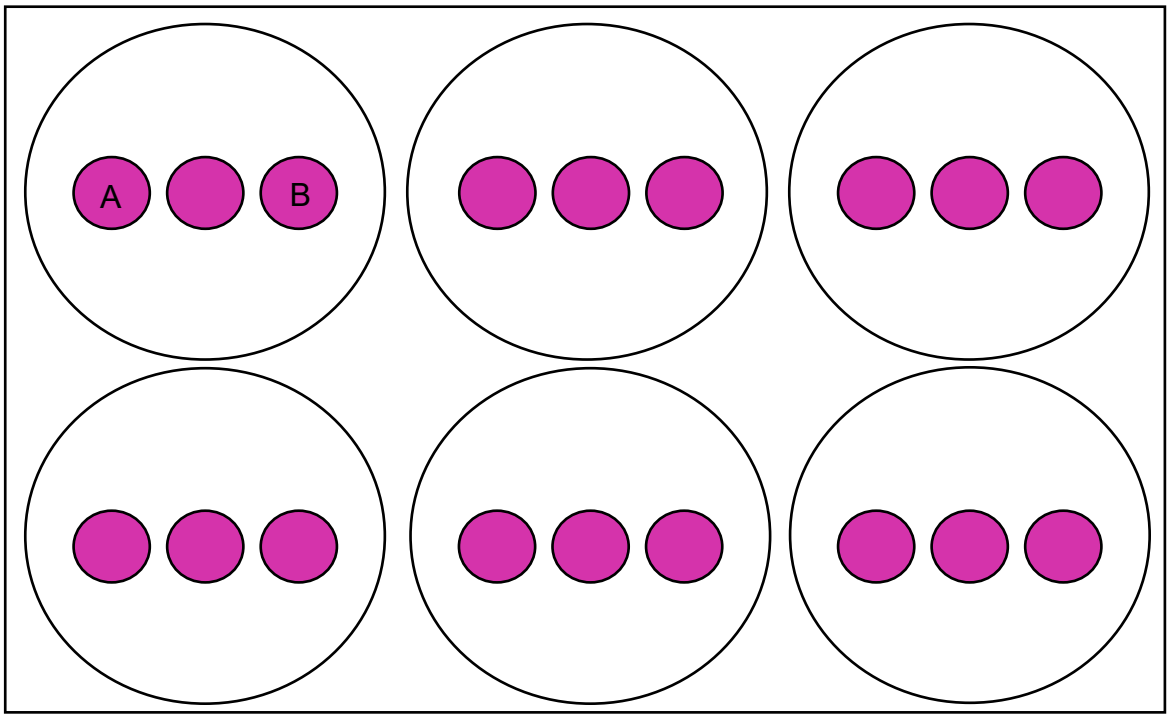
3.5 Avaliação da migração celular em membrana de *Transwell*

Após plaquear 3.10^4 células por *transwell* as células foram cultivadas por 24 horas em meio DMEM/F12 completo antes da aplicação dos estímulos alvo. Assim que as células se encontraram aderidas, foi removido o meio de cultura completo, e no *well* inferior foi acrescentado 200µl de meio DMEM/F12 sem suplementação contendo o estímulo alvo diluído em q.s.p este volume final pré-determinado. O *transwell* foi redepositado no *well*, e na porção superior, foi adicionado meio de cultura DMEM/F12 sem suplementação. Após 24 horas foi feita a avaliação da migração celular pelas técnicas de microscopia, e os sobrenadantes congelados em -80 ºC para futura avaliação por citometria.

3.6 Avaliação da migração das células ARPE-19 pela técnica de *Under Agar*.

O *well* foi preparado com uma das soluções contendo agarose, e após sua completa solidificação, com o auxílio de um trépano esterilizado e pinça foram realizados três orifícios na agarose com distância simétrica de 7mm entre si, e paralelos. Após o preparo da placa. As células foram plaqueadas em uma concentração determinada de 3.10^4 células/ 100µl sempre no orifício central. A placa foi identificada e os lados foram denominados lado A, sem estímulo ou controle negativo; e lado B, com estímulo alvo (Figura 1).

Figura 1 - Disposição das áreas de estímulo, em uma placa de 6 *wells*, onde A: controle negativo, e B: estímulo.



Fonte: Produção do próprio autor

3.7 Infecção experimental das células ARPE-19

Após 24 horas de cultivo em garrafa 25cm^2, Corning®, foi incluído em 5ml de meio de cultura 1,2.10^7 parasitas. Seguindo a proporção estimada de 5 parasitas para cada 1 célula. Após o período de 24 horas, o meio de cultura substituído por meio suplementado com SFB 10%. E as células foram mantidas em cultivo por mais três dias, e o sobrenadante coletado.

3.8 Desenho experimental comparativo entre as células ARPE-19 infectadas e não infectadas pelo *Toxoplasma gondii*

Após termos estabelecidos a cultura infectada. Tanto as células ARPE-19 saudáveis quanto as infectadas foram plaqueadas na proporção de 3.10^4 células nas membranas de *Transwell*, e nos poros do ágar. Respeitando os volumes necessários para cada técnica. Em seguida os estímulos alvos, foram delimitados como:

1. Meio de cultura DMEM/ F12 completo, para o grupo controle;
2. Meio de cultura DMEM/ F12 com 9.10^2 taquizoitas/µl, para o grupo Parasita;
3. Meio de cultura DMEM/ F12 contendo 5.10^{-3}µg/100µl de antígeno RH, para o grupo antígeno 0,5;
4. Meio de cultura DMEM/ F12 contendo 1.10^{-2}µg/µl de antígeno RH, para o grupo antígeno 1;
5. Meio de cultura DMEM/ F12 contendo 2.10^{-2}µg/µl de antígeno RH, para o grupo antígeno 2;
6. Meio de cultura DMEM/ F12 contendo $2,5.10^{-3}$µg/µl de antígeno RH, para o grupo antígeno 0,25;
7. Meio de cultura DMEM/ F12 contendo $1,25.10^{-3}$µg/µl de antígeno RH, para o grupo antígeno 0,125;
8. Sobrenadante resultante das culturas de ARPE-19 infectadas com o *T. gondii* RH, para o grupo Sobrenadante.

Após 24 horas de exposição, o meio de cultura foi coletado e armazenado a -80ºC para análises futuras por citometria, e as células fixadas com PFA 4% ou Glutaraldeido 2,5% para a aplicação das técnicas de microscopia.

3.9 Teste comparativo dos efeitos da migração entre ARPE-19 e RAW.

Após a transferência para o *insert transwell* e a confluência alcançada em 24 horas, as células foram subdivididas em cinco grupos, sendo estes: RAW, ARPE-19 e ARPE-19 infectadas; RAW associado a ARPE-19, e RAW associado a ARPE-19 infectada.

Por 24 horas, as células tiveram o meio de cultura completo retirado, e acresceu-se meio DMEM sem soro por 24h, este sobrenadante foi retirado e armazenado em -80ºC, e após 24 horas foi coletado o sobrenadante pós-exposição ao *T. gondii*, armazenado nas mesmas condições para análises posteriores de suas citocinas.

3.10 Desenho experimental e divisão dos grupos experimentais *in vivo*

Os animais foram divididos em três grupos, sendo estes: controle, os quais os animais não foram submetidos a nenhum procedimento invasivo; imunizados, que receberam quinzenalmente, três doses de 300µl contendo 1.10^8 taquizoítos da cepa ME-49, irradiados a 255Gy; e infectados, os quais receberam uma dose única de 300µl contendo de 3.10^6 taquizoitos da cepa ME-49, isolados de camundongos C57BL/J6.

3.11 Isolamento de células do epitélio pigmentado da retina de animais C57BL/J6

Após o período de 45 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2, e tiveram os bulbos dos dois olhos enucleados em ambiente estéril. Primeiramente, foi realizada a assepsia dos animais, imergindo-os em solução de iodopovidona e etanol 70% (v:v). A enucleação foi realizada segundo descrito por Shang *et al*. [60]. Após a enucleação, os olhos foram imersos em solução de digestão, contendo Colagenase D (PROMEGA®) 0,2% em DMEM e incubados a 37ºC, umidade e 5% de CO_2 por 45 minutos. Posteriormente o tecido foi dissociado mecanicamente e ressuspendido em placas de 24 *wells*, considerando 2 bulbos por *well*.

3.12 Cultura celular primária

As células do epitélio pigmentado da retina isolados de camundongo C57BL/J6 foram cultivadas até a sua confluência utilizando meio DMEM, SFB 10%, 1% antibiótico e 1% glutamina. Após isso as células foram tripsinizadas e transferidas para um *insert transwell*, em uma concentração determinada de 2.10^5 células por *well*.

3.13 Identificação da migração celular

Após o período de incubação as placas tiveram seus sobrenadantes coletados e as células foram fixadas com solução aquosa de paraformaldeido 4% em PBS ou glutaraldeido 2,5%, em tampão cacodilato de sódio a 0,5M dependente da técnica a ser empregada posteriormente, sendo microscopia de luz e microscopia eletrônica, respectivamente.

Para a análise visual das amostras foi empregado duas técnicas de microscopia: visando o aspecto geral, foi utilizado a técnica de microscopia confocal e microscopia de luz; e pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão, observar de forma individual os efeitos migratórios da célula mediante estímulos

3.13.1 Microscopia de luz

As amostras cultivadas em *transwell*, foram fixadas em paraformaldeido (PFA) 4% por 24 horas. A desidratação das amostras em concentrações crescentes de solução etanólica (70, 80, 90% e álcool absoluto) foi realizada por 10 minutos, sendo a última passagem repetida por duas vezes; ao fim da desidratação, fez-se uma pré-inclusão em uma solução contendo 50% do volume de álcool etílico e 50% do volume de historresina Technovit 7100 – Külzer©, *overnight*. Após este procedimento a amostra foi imersa em solução de historresina pura por 4 horas e, ao fim deste preparo foram incluídas em molde próprio para amostras histológicas, preenchidos com a solução de historresina e seu polímero. Após a polimerização, estas amostras foram fixadas a um suporte de madeira previamente identificado, e cortes de 1µm foram realizados. Coletados os cortes histológicos em lâmina de vidro, as amostras foram coradas por 1 minuto com solução de DAPI (D1306, Invitrogen®), lavadas com solução de PBS, secas e montadas com meio para montagem Erv-Mount (EasyPath®), ao fim da montagem foram observadas em microscópio de luz e as imagens registradas com auxílio de câmera (Nikon Eclipse TI) e software (NIS-Elements BR 3.1)

3.13.2 Microscopia confocal

Após fixadas com paraformaldeido 4% por 20 minutos, as amostras foram lavadas com PBS e coradas com Violeta Cristal 2% por 30 minutos até a completa cobertura da amostra. Depois de lavadas com PBS até a remoção do excesso de solução Violeta Cristal e observadas no microscópio confocal Leica (SP8, Leica®)

3.13.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a fixação das amostras com glutaraldeido 2,5%, estas foram lavadas com tampão Cacodilato de sódio ($C_2H_6AsNaO_2$) 0,1M duas vezes, e pós fixadas por 1 hora com Tetróxido de ósmio a 4ºC, e novamente lavadas com Tampão Cacodilato de sódio por 15 minutos. Após fixação as amostras foram desidratadas com diferentes gradientes de etanol em água destilada (35, 50, 70, 95 e 100% duas vezes) por 10 minutos cada imersão, dando início a infiltração do material com partes de etanol e resina, respectivamente sendo 3:1, 2:2, 1:3 e resina Epon pura, tendo cada imersão por 30 minutos e as duas últimas *overnight*. Após a infiltração as amostras foram orientadas em moldes de inclusão e polimerizadas por dois dias a 60ºC.

Após a inclusão das amostras na resina, o bloco foi desgastado para expor a amostra, e foram realizados cortes semi-finos com 0,5µm para identificação previa pela coloração utilizando azul de toluidia 1%, seguida de cortes de 0,8µm para análise. Com o auxílio de uma lâmina de diamante, os cortes foram realizados e as amostras dispostas em água deionizada. Posteriormente, utilizando grades de cobre de 3mm com *mesh* de 200µm, as amostras foram coletadas e armazenadas. As grades foram secas com papel filtro de 11cm, e em seguida corados com acetato de uranila saturada por 15 minutos. As amostras foram lavadas com água destilada e reveladas com citrato de chumbo e citrato de sódio por 8 minutos. As soluções foram descartadas e o material lavado novamente com água deionizada e armazenados em vidro após a secagem. Os tomos foram observados em microscópio eletrônico (JEM1011) o qual foi operado pela técnica Cleusa Fumika Hirata Takakura do LIM59 – Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.14 Dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17 produzidas pelas células do epitélio pigmentado da retina in vitro

Após a incubação, o sobrenadante coletado foi utilizado para análise das dosagens de citocinas. Para a análise das citocinas foi utilizado um kit comercial Cytometric Bead Array® Th1, Th2 e Th17 (CBA BD Biosciences®), o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após o preparo das amostras, a análise foi feita no citômetro de fluxo LSRFortessa BD Biosciences®. Os dados foram coletados pelo *software* BD FACSDIVA® (BD Biosciences®) e analisados pelo *software* FCAPArray V 3.0® (BD Biosciences®).

3.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando *software* GraphPad Prism ® 6.0. Foram consideradas significantes as comparações cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($p < 0.05$). A comparação dos grupos foi feita utilizando o teste ANOVA e comparação entre os grupos pelo teste de comparação múltipla de Turkey.

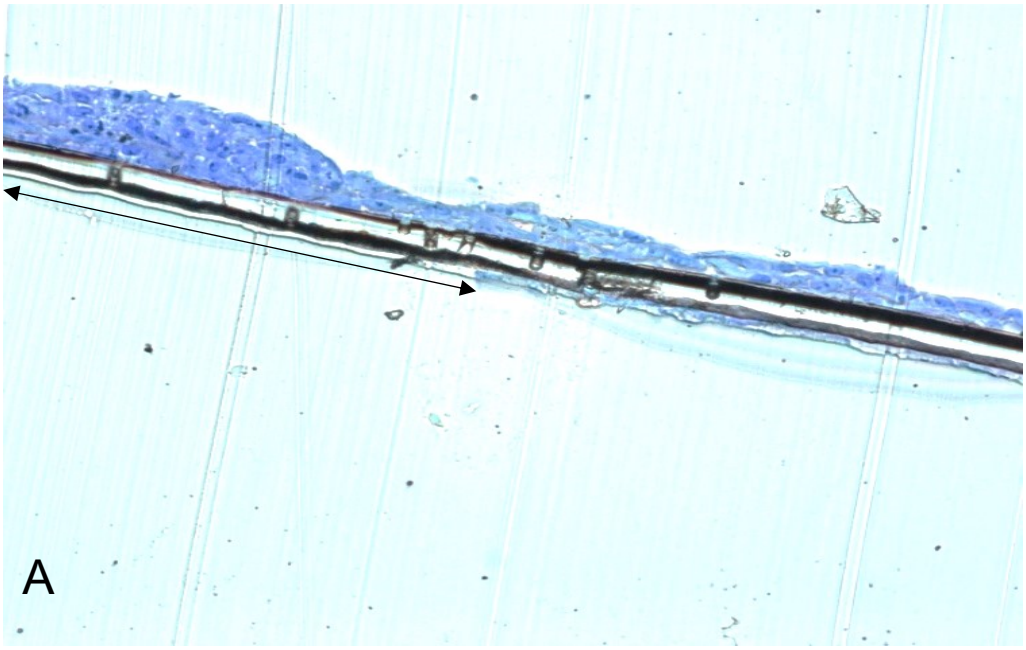
As amostras de ARPE-19 tiveram o impacto das citocinas em relação aos tipos de estímulos avaliados pelo teste D de Cohen, onde foi possível calcular o tamanho do efeito e suas relações, classificando os em baixo quando inferior ou igual a 0,5, médio entre os valores de 0,5 e 0,8; e alto quando superior a 0,8.

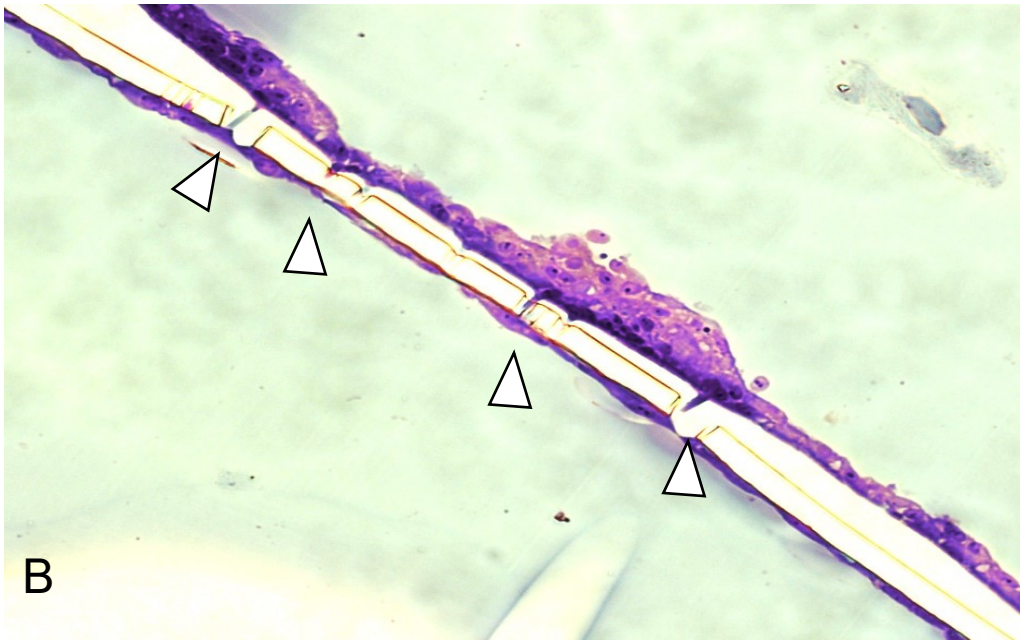
4 RESULTADOS

4.1. Migração celular das células ARPE-19 pela membrana de *Transwell*

As células ARPE-19 cultivadas em membrana *transwell* apresentaram migração quando expostas ao *T. gondii* da cepa RH. O efeito migratório ocorreu de maneira satisfatória tal qual todos os poros da membrana *transwell* se mostraram preenchidos, quando comparados ao grupo controle. No grupo controle obtivemos o efeito de migração, porém em menor proporção, com porções da membrana não preenchidas na porção dorsal.

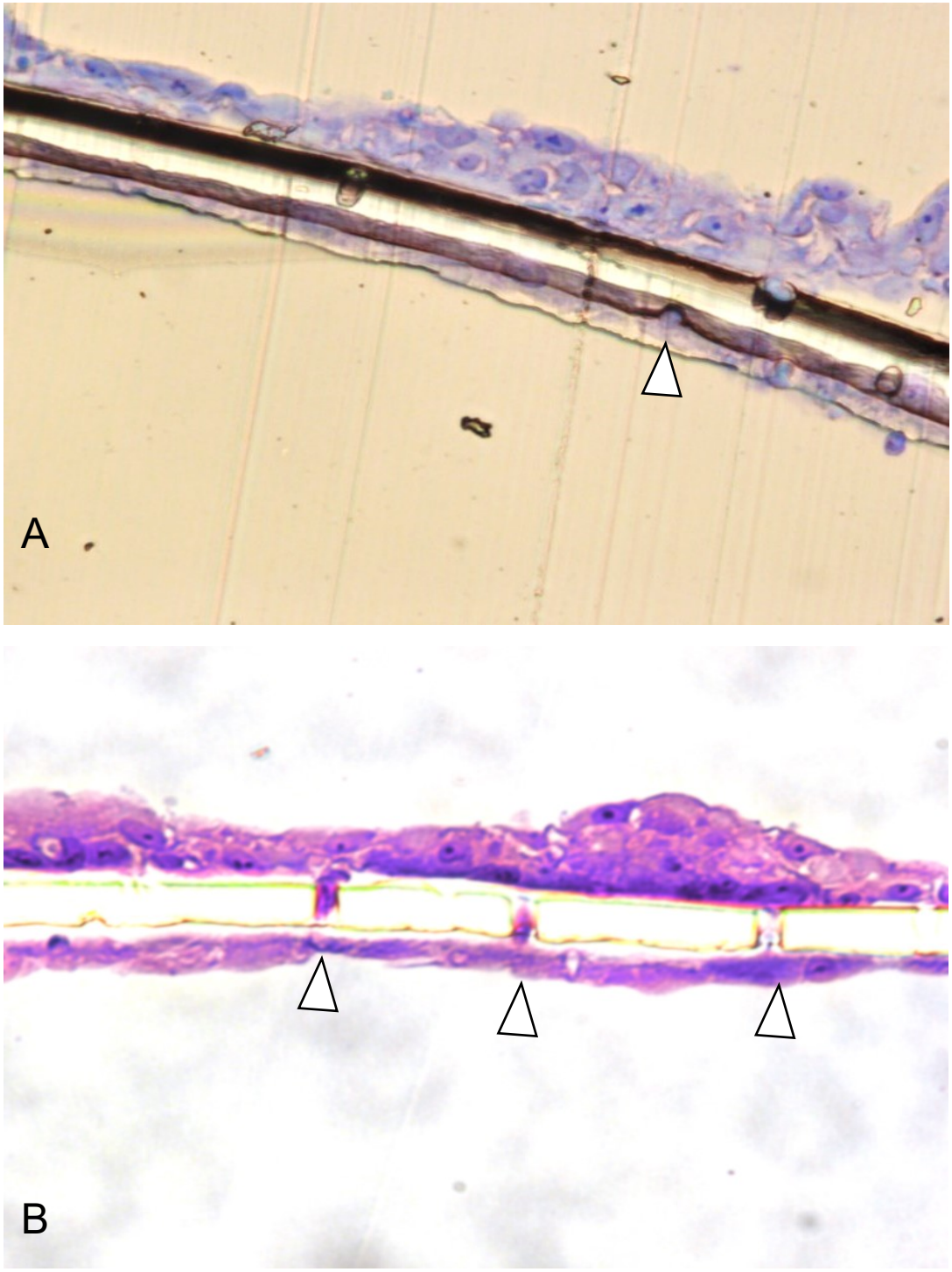
Figura 2 - Aspecto geral do evento migratório das células ARPE-19 cultivadas em membrana de *transwell*. **A** Controle, seta dupla indicando área que não contém células, em aumento de 20x. **B**. Célula ARPE-19 exposta na porção basal ao *Toxoplasma gondii* da cepa RH, por 24 horas, contorno de seta indicando regiões dos poros preenchidas por células, aumento de 20x





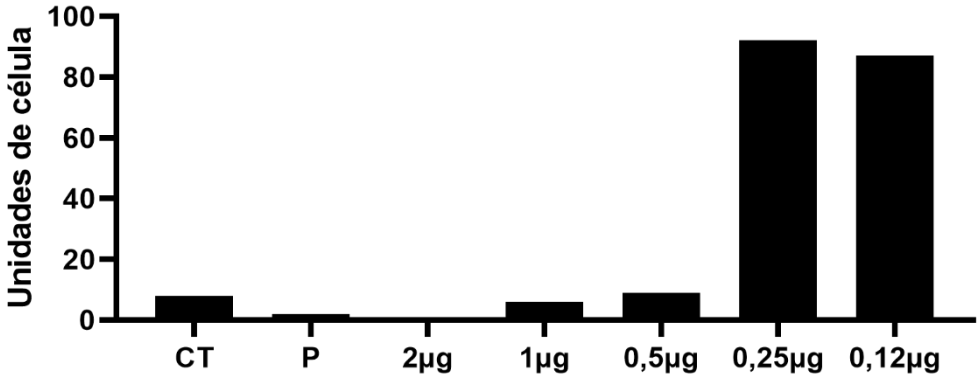
Fonte: Produção do próprio autor

Figura 3 - Aspecto geral do evento migratório das células ARPE-19. **A** Controle, em aumento de 40x. **B**. Célula ARPE-19 exposta na porção basal ao *Toxoplasma gondii* da cepa RH por 24 horas, contorno de setas indiciam as regiões dos poros preenchidos, aumento de 40x



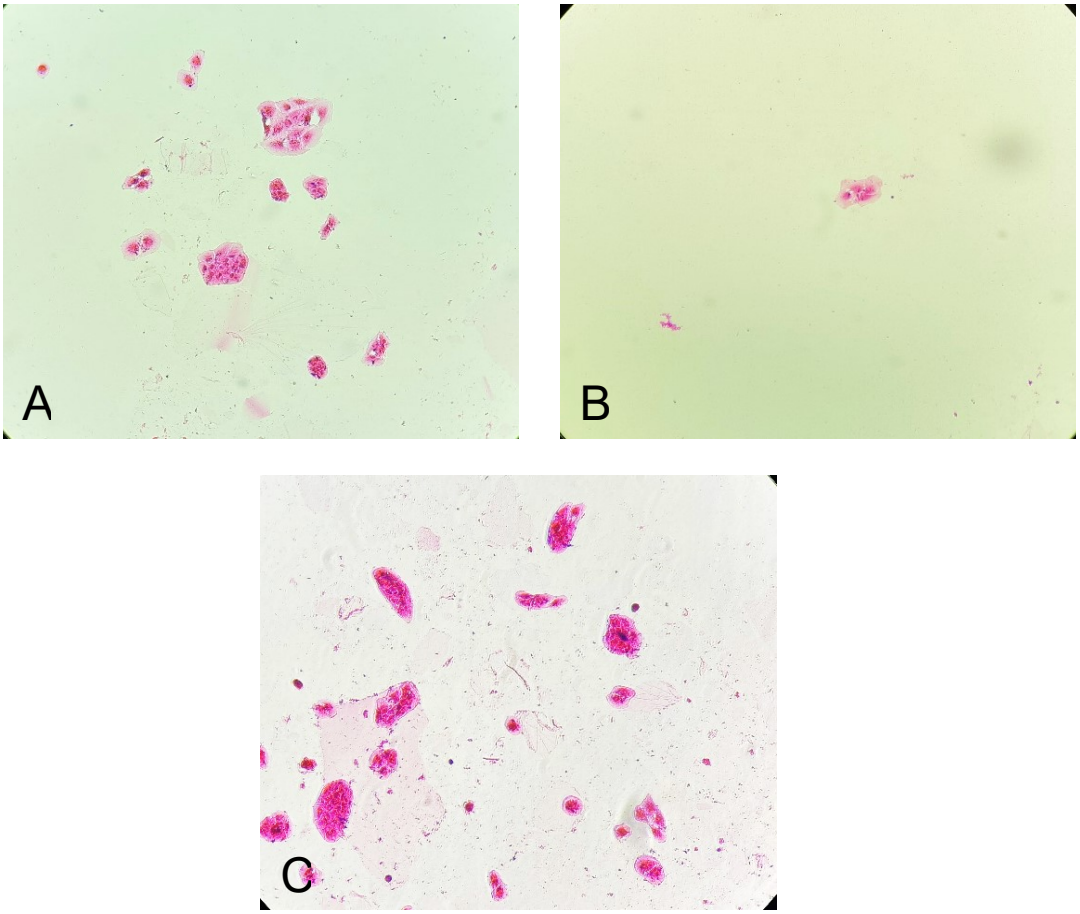
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 1 - Número de células contadas na parte inferior do *well*, representativa do número de células que destacaram da porção inferior da membrana pós migração



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 4 - Número de células ARPE-19 aderidas à porção inferior do *well*, após migração pela membrana do *insert transwell*. **A** Células do grupo controle contendo meio de cultura sem suplementação; **B.** Células ARPE-19 aderidas após exposição ao *T. gondii* da cepa RH; **C.** Células ARPE-19 após exposição ao antígeno em concentração de $2{,}5.10^{-3}$µg/µl de antígeno em meio de cultura DMEM. Aumento 20x

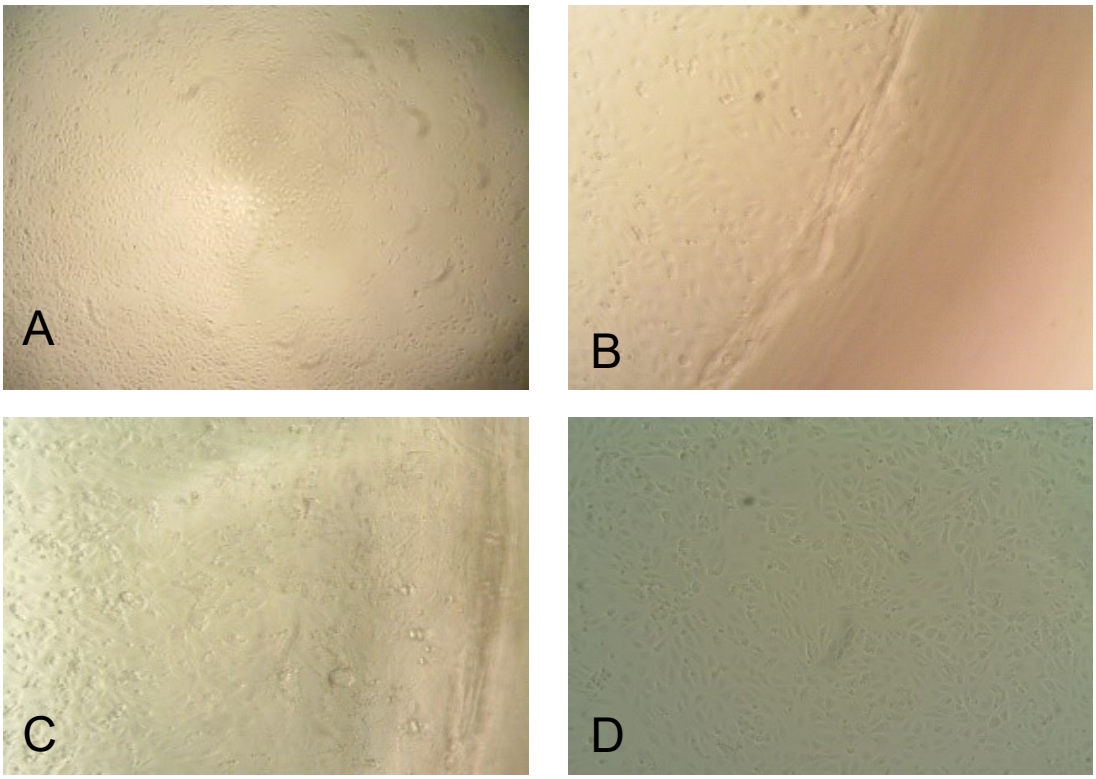


Fonte: Produção do próprio autor

4.2. Avaliação do número de células cultivadas para a técnica de *Under* ágar

Dentre as densidades escolhidas para o plaqueamento das células ARPE-19 no *well* feito com o ágar, a que apresentou melhores características foi a de 25.000 células, uma vez que nesta densidade não houve “buracos” quanto a disposição das células, como visto abaixo de 10.000 células. E nem excesso de células, como observado nas culturas com 50.000 células. Permitindo que o material que estivesse migrando por baixo do ágar tivesse origem apenas pelo estímulo gerado e não pelo excesso de células aglomeradas em um único ponto.

Figura 5 - Aspecto geral das células ARPE-19 cultivadas no *well* de ágar utilizado na técnica de *Under-agar*. **A.** Densidade de 5000 células; aumento 5x **B.** 10.000 células, aumento 10x; **C.** 25.000 células, aumento 10x; **D.** 50.000 células, aumento 10x.

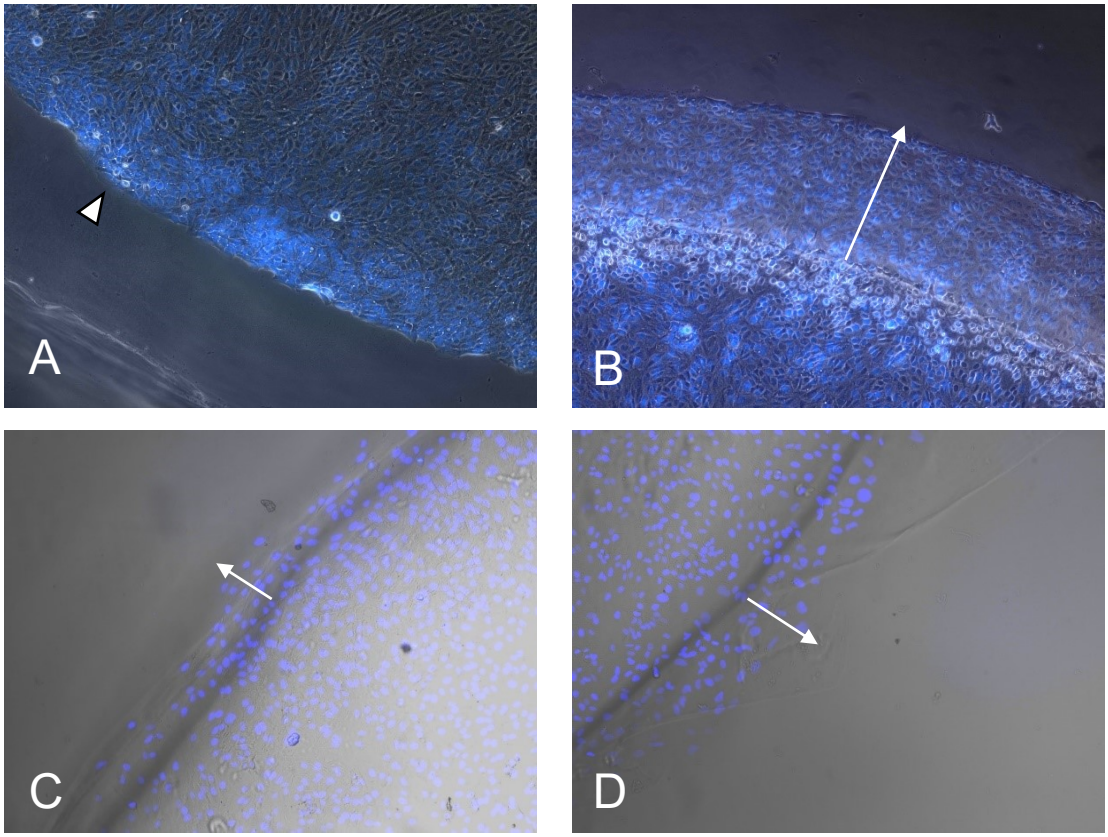


Fonte: Produção do próprio autor

4.3. Avaliação da migração celular das células ARPE-19 pela técnica de *Under* agar

As células observadas pela técnica de *under* agar apresentaram migração tanto para o lado estimulado positivamente, quanto para o lado controle, porém o crescimento para o lado estimulado com Soro Fetal Bovino, foi possível observar um crescimento com maior distância percorrida. A célula ARPE-19 não infectada apresentou crescimento com maior desempenho quando comparada as células ARPE-19 previamente infectada.

Figura 6 - Distância percorrida a partir do crescimento celular por estímulo. **A.** Estímulo negativo do grupo controle, onde o contorno de seta indica região com crescimento basal; **B.** Crescimento celular da ARPE-19 não infectada apresenta a distância deslocada (seta longa), estimulada pela presença do SFB. **C.** ARPE-19 infectada, a seta indica o crescimento celular percorrido para *well* controle; **D.** ARPE-19 infectada com *T. gondii*, onde a seta indica a distância percorrida após estímulo com SFB. Aumento 10x.

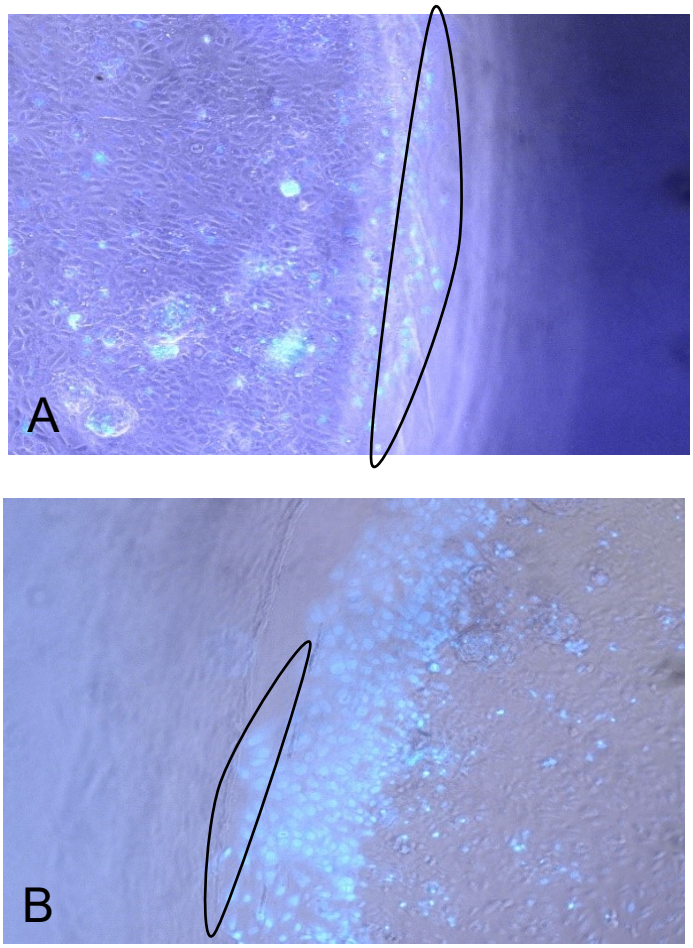


Fonte: Produção do próprio autor

As células ARPE-19 não infetadas e as células ARPE-19 infectadas com os parasitas não apresentaram sinais de migração celular pela técnica de *under* ágar. Porém algumas estruturas que se assemelhavam ao parasita foram observadas, dentro do *well* contendo as células plaqueadas.

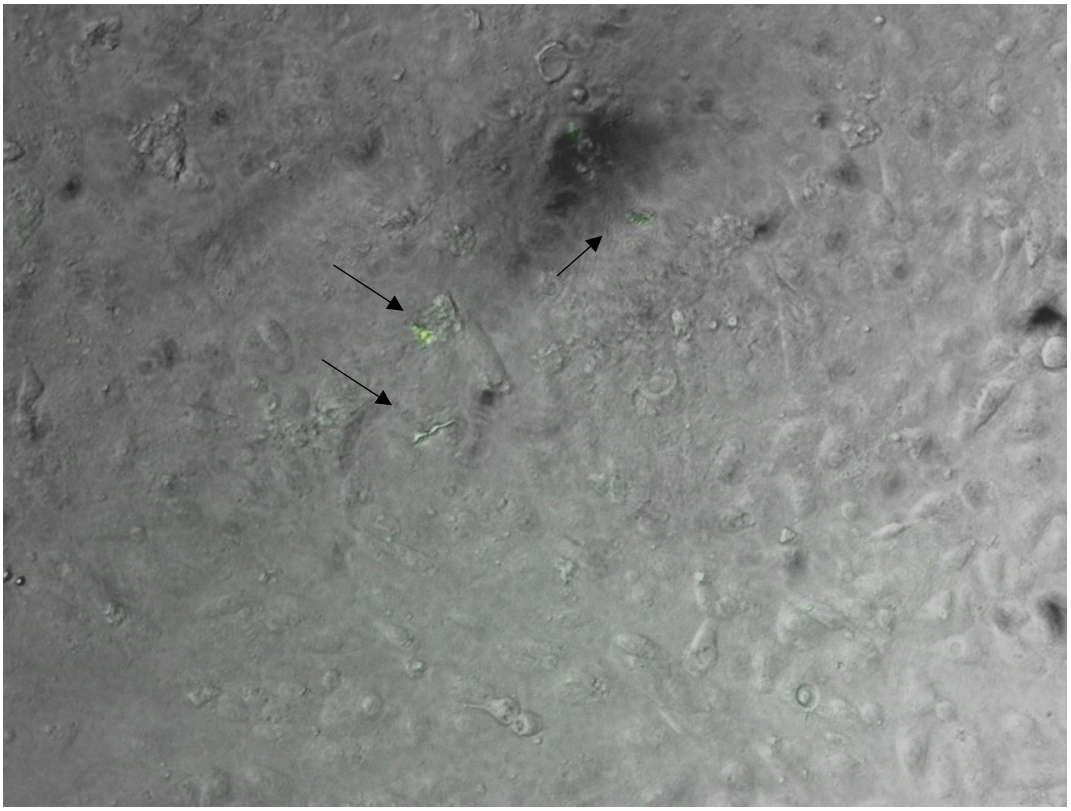
Neste caso, a migração do parasita ocorreu em um tempo menor que o período de 24 horas, interferindo expressivamente no experimento de migração. Esta migração foi confirmada após o estímulo com o *T. gondii* vivo, utilizando o parasita YFP.

Figura 7 - Avaliação geral do evento migratório da célula ARPE-19 exposta ao parasita, (área delimitada) demonstra a região limite da membrana, sem ultrapassagem das células **A.** Controle experimental; **B.** Estímulo com o parasita vivo. Aumento 10x.



Fonte: Produção do próprio autor

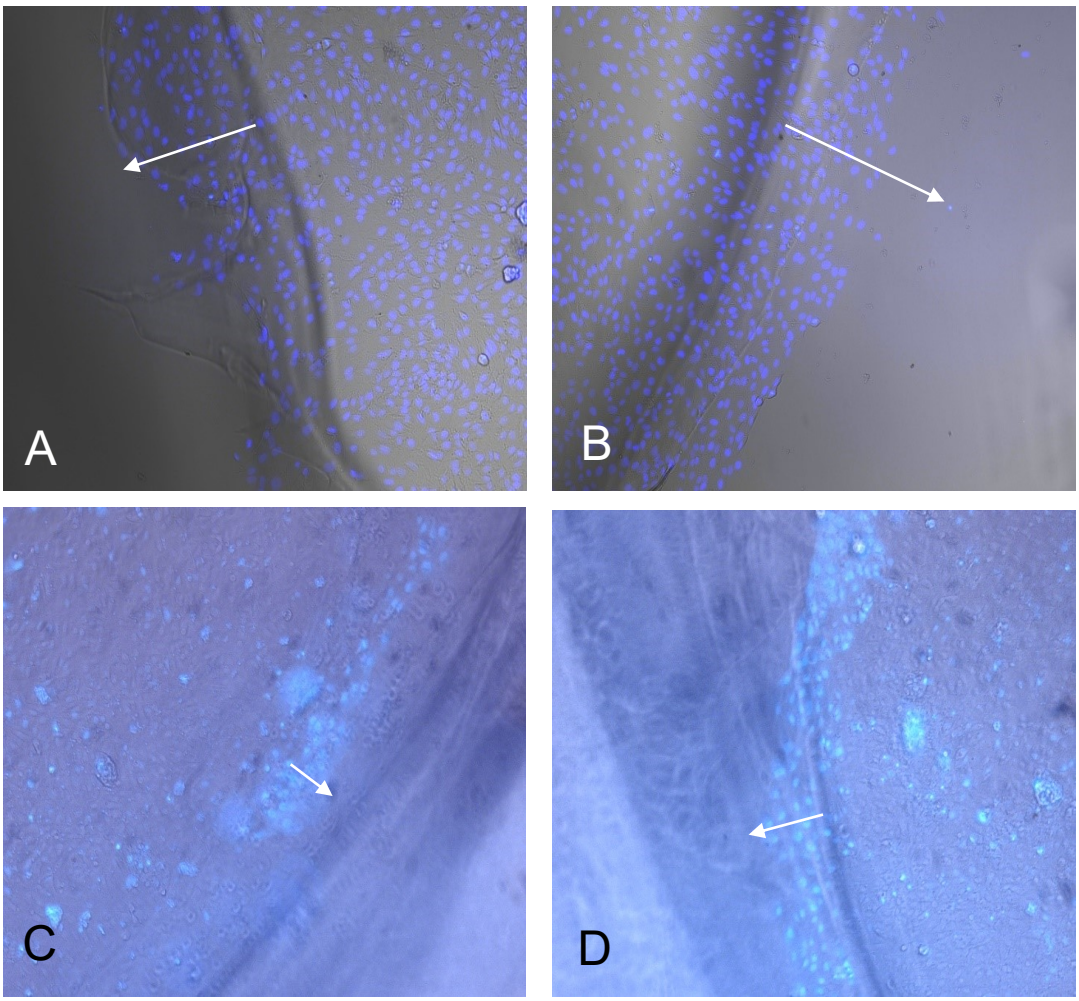
Figura 8 - Células ARPE-19 expostas ao parasita plaqueados em *wells* diferenciados na técnica de *under agar*, setas demonstram parasitas que migraram antes da migração das células ARPE-19, em aumento de 40x.



Fonte: Produção do próprio autor

As células expostas ao sobrenadante não apresentaram grandes diferenças quanto aos eventos migratórios, apesar de algumas amostras apresentarem uma maior distância percorrida na ARPE-19 saudável em relação a ARPE-19 infectada previamente.

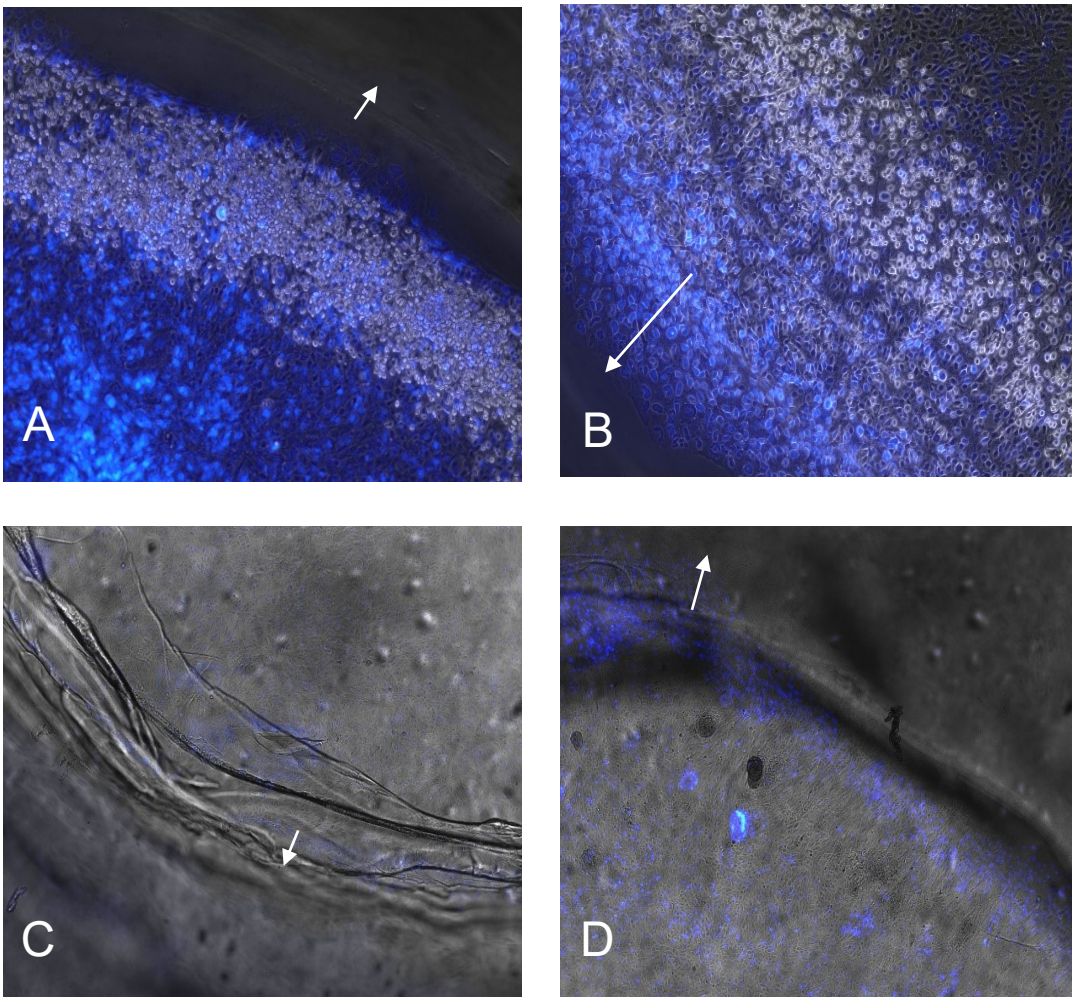
Figura 9 - Células expostas ao sobrenadante obtido em cultura celular de ARPE-19 infectadas. **A.** ARPE-19 controle (seta) migração celular basal; **B.** (seta) migração celular observado por estímulo ao sobrenadante. **C.** ARPE-19 infectada com *T. gondii* (seta longa) migração celular; **D.** Célula infectada (seta) migração após estímulo do sobrenadante. Aumento 10x.



Fonte: Produção do próprio autor

A célula ARPE-19 apresentou migração quando exposta ao antígeno de *T. gondii* na proporção de 5.10^{-3}µg/µl, diferentemente da ARPE-19 infectada, que apresentou um evento migratório baixo, porém responsivo. A ARPE-19 previamente infectada se mostra com crescimento mais lentificado tanto para o controle quanto para o estímulo.

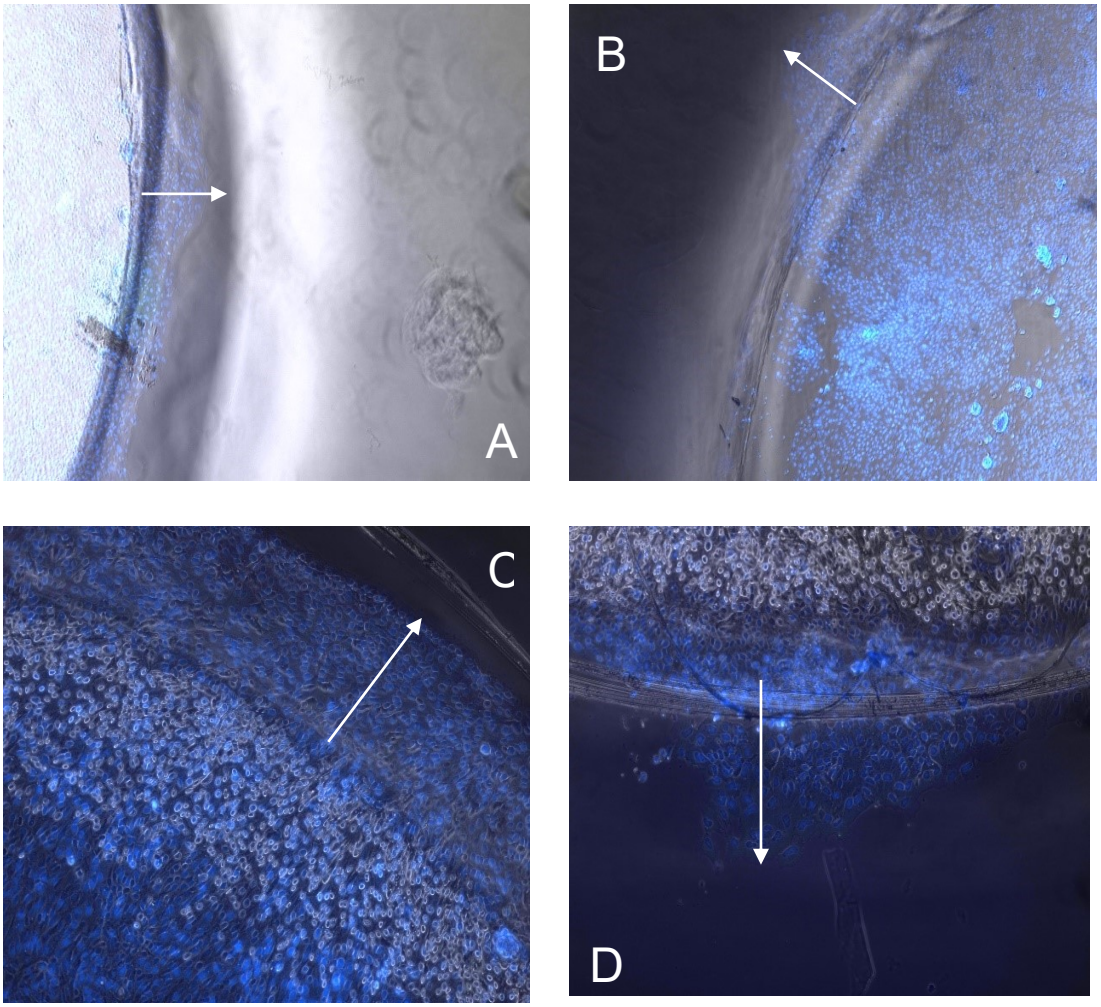
Figura 10 - Migração celular da ARPE-19 exposta ao antígeno do *T. gondii* em proporção de 5.10^{-3}µg/µl por 24 horas. **A.** Controle negativo, **B.** Estímulo com antígeno; **C.** ARPE-19 infectada, controle negativo, **D.** Estímulo com antígeno (setas), evento migratório e distância percorrida. Aumento 10x.



Fonte: Produção do próprio autor.

A célula ARPE-19 apresentou migração quando exposta ao antígeno de *T. gondii* na proporção de 1.10^{-2}µg/µl, diferentemente da ARPE-19 infectada, que apresentou um evento migratório baixo, porém responsivo. A ARPE-19 previamente infectada se mostra com crescimento mais lentificado tanto para o controle quanto para o estímulo.

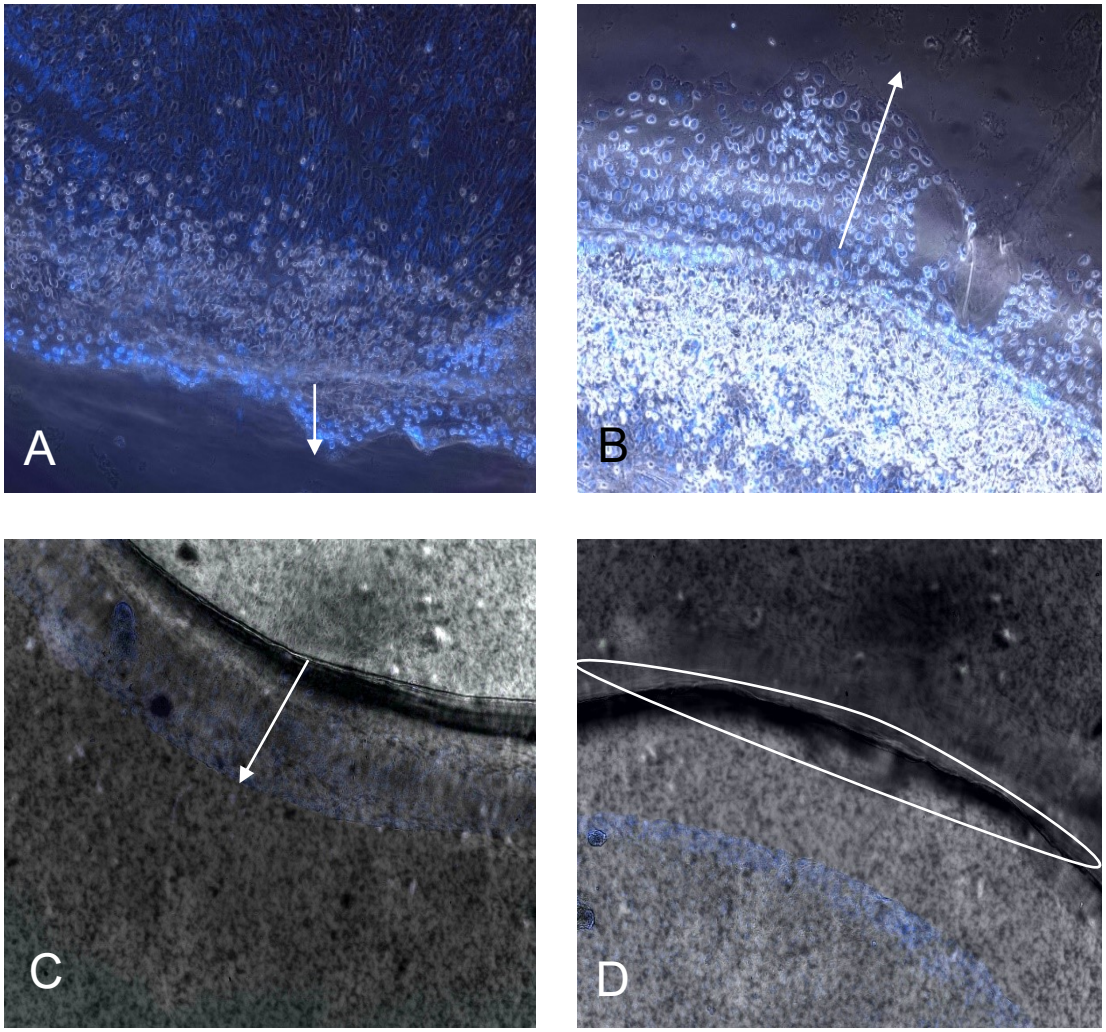
Figura 11 - Migração celular da ARPE-19 exposta ao antígeno do *T. gondii* em proporção de 1.10^{-2}µg/µl por 24 horas. **A.** Controle negativo, **B.** Estímulo com antígeno; **C.** ARPE-19 infectada, controle negativo, **D.** Estímulo com antígeno (setas), evento migratório e distância percorrida. Aumento 10x.



Fonte: Produção do próprio autor

As células ARPE-19 apresentaram migração quando exposta ao antígeno de *T. gondii* na proporção de 2.10^{-2}µg/µl, diferentemente da ARPE-19 infectada, que apresentou um evento migratório baixo, em relação às demais concentrações (5.10^{-3}µg/µl e 1.10^{-2}µg/µl), porém responsivo. A ARPE-19 previamente infectada se mostra com crescimento mais lento tanto para o controle quanto para o estímulo.

Figura 12 - Migração celular da ARPE-19 exposta ao antígeno do *Toxoplasma gondii* na concentração de 2.10^{-2}µg/µl, por 24 horas. **A.** Controle negativo, **B.** Estímulo com antígeno; **C.** ARPE-19 infectada, controle negativo, **D.** Estímulo com antígeno (setas), evento migratório e distância percorrida, (área delimitada) indica região limite do ágar. Aumento 10x.

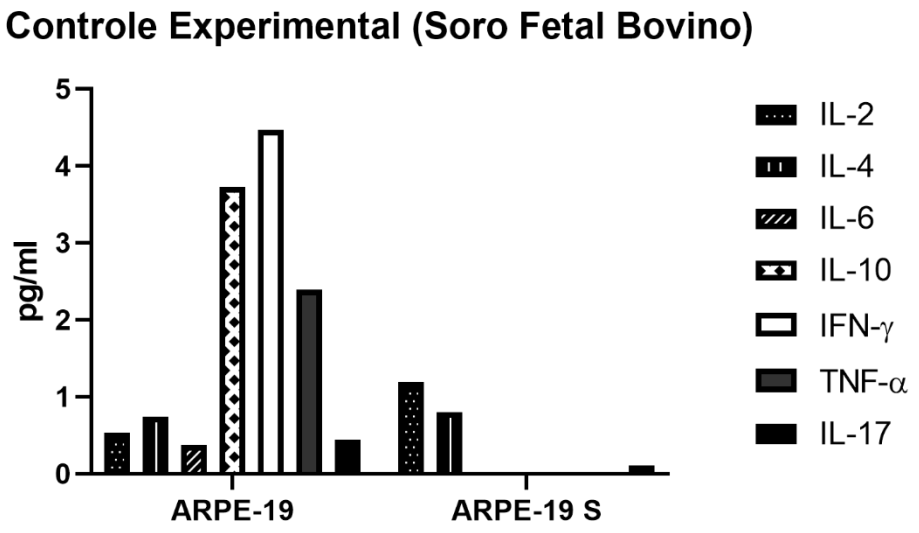


Fonte: Produção do próprio autor

4.4. Análise de citocinas de células ARPE-19 mediante exposição ao *T. gondii*

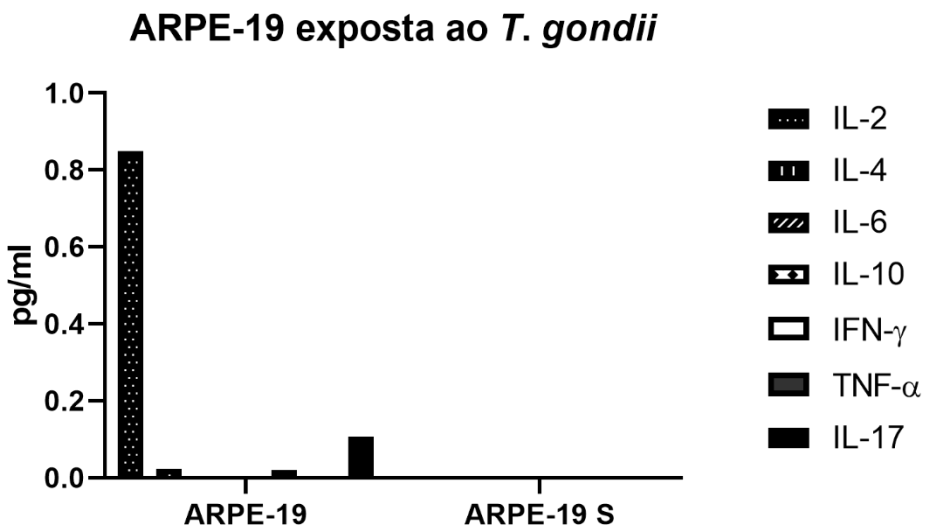
As citocinas dosadas na célula ARPE-19 e ARPE-19 previamente infectadas não expressaram quantidades suficientes das citocinas alvo pelo kit CBA, com exceção aos níveis de IL-6, IL-10 e TNF-α em algumas situações de exposição, como o grupo controle.

Gráfico 2 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Controle.



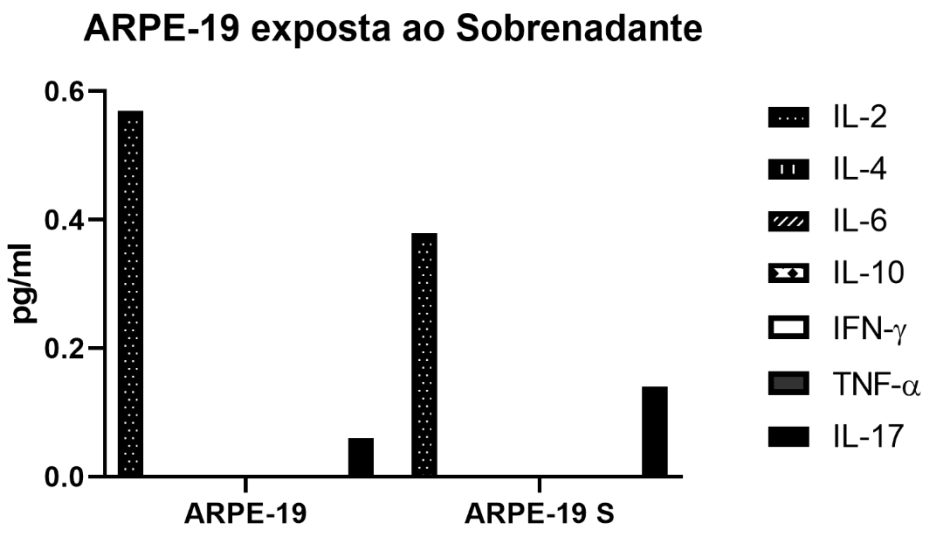
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 3 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Parasita.



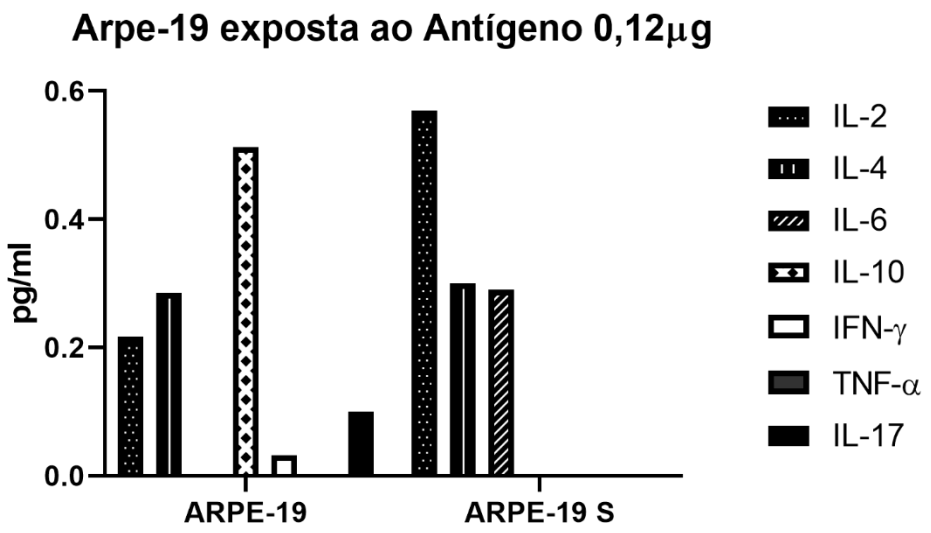
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 4 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Sobrenadante.



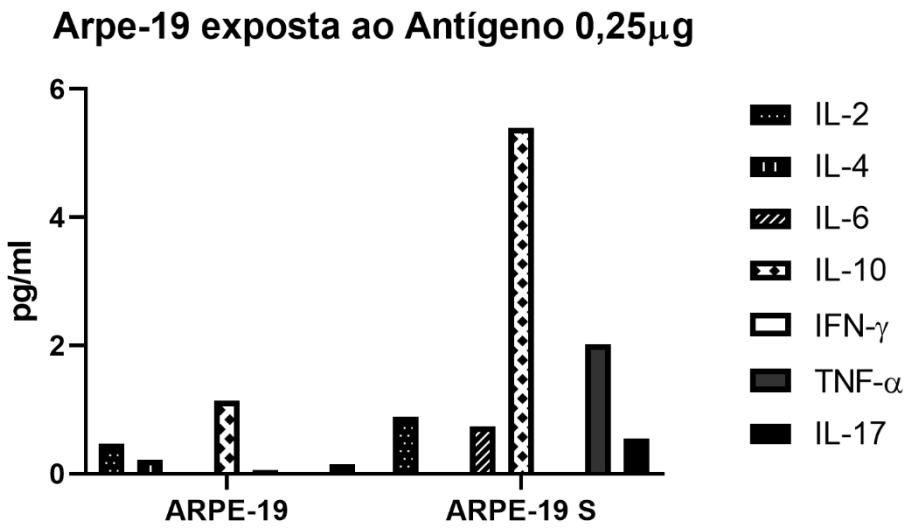
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 5 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 0,125µg.



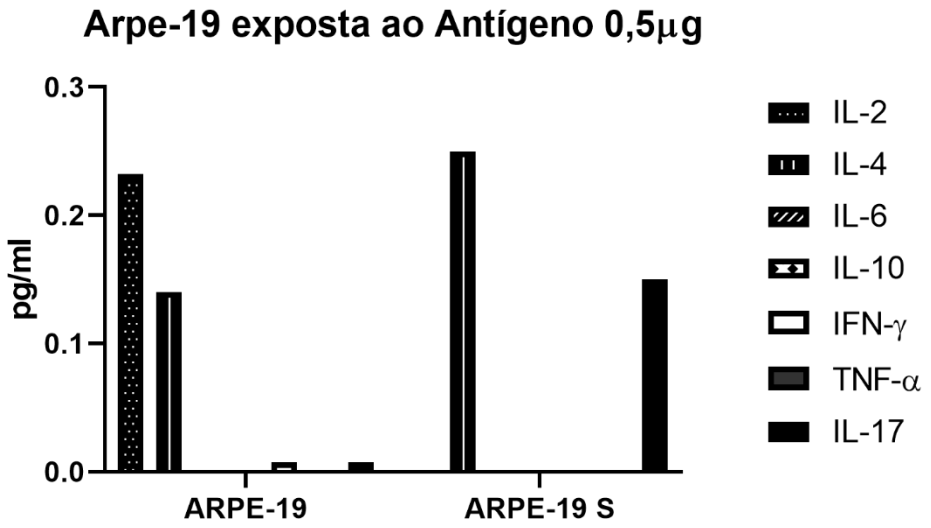
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 6 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 0,25µg



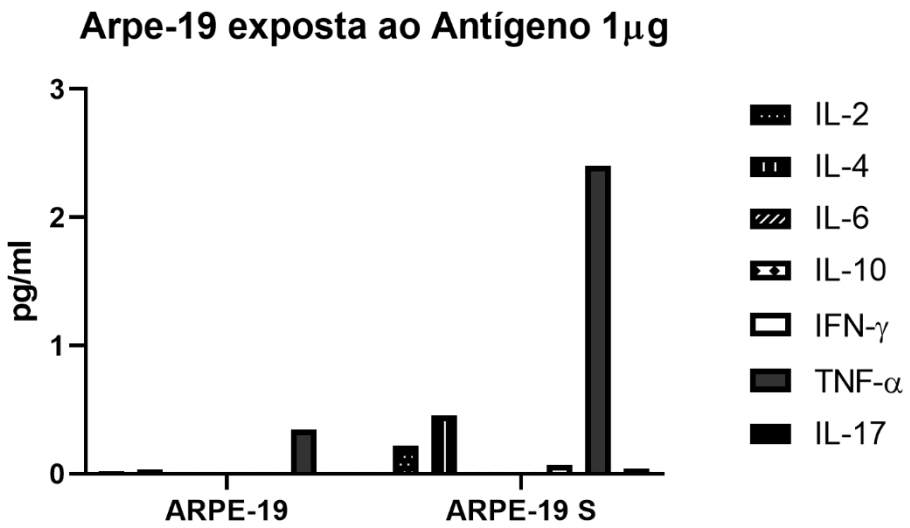
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 7 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 0,5µg



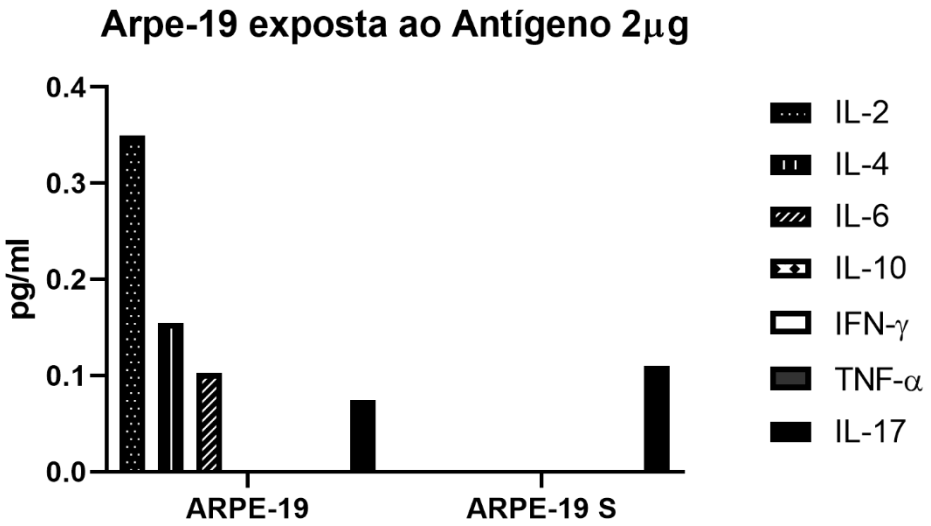
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 8 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 1µg



Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 9 – Comparação de citocinas entre ARPE-19 infectadas e não infectadas, Grupo Antígeno 2µg



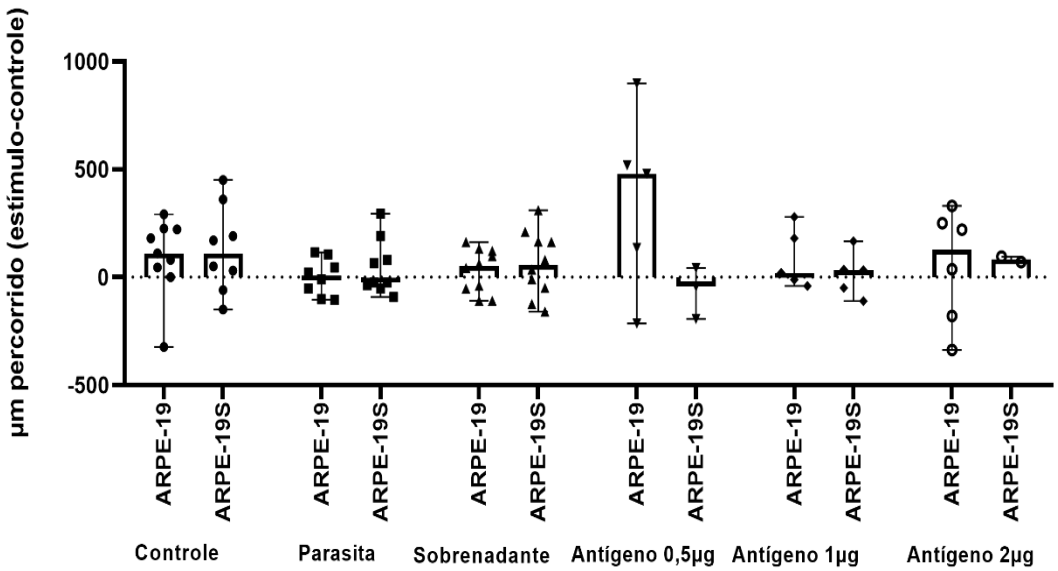
Fonte: Produção do próprio autor

4.5. Avaliação da migração celular comparada entre células ARPE-19 infectada e não infectada

Ao observarmos as distâncias percorridas é possível perceber que a célula ARPE-19 é capaz de identificar estímulos, já descritos nos experimentos utilizando o parasita ou SFB (controle). Com enfoque para a amostra exposta ao antígeno na concentração de 5.10^{-3}µg/µl, onde esta proporção é capaz de gerar um desempenho maior por parte da célula ARPE-19, e principalmente quando comparada ao grupo infectado, na qual a célula ARPE-19 pode ser capaz de identificar esta expressão, mas não realiza a migração em sentido ao estímulo, gerando valores negativos.

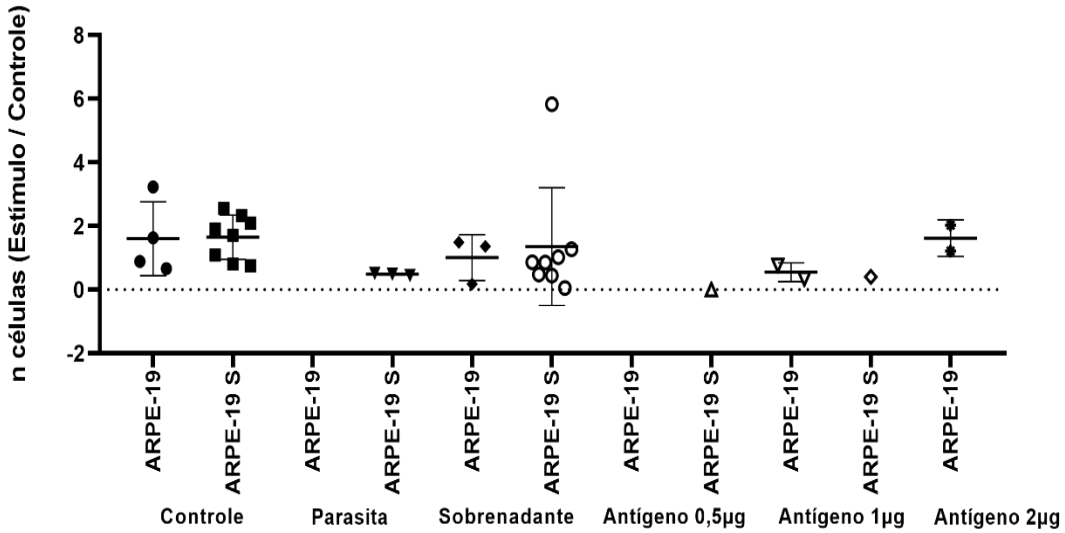
O número de células migradas curiosamente se mostrou o mesmo independente do estímulo, reforçando o número de células plaqueadas e a resposta obtida, mas o que se destaca é que apesar de termos o mesmo número de células, estas migram mais quando exposta a 0,5µg de antígeno.

Gráfico 10 - Média do desempenho da célula ARPE-19 em relação à distância percorrida em µm, comparando a distância do estímulo, menos a distância do controle obtido nas mesmas amostras



Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 11 - Razão do número de células contadas entre o perímetro percorrido por estímulo, e o controle negativo.



Fonte: Produção do próprio autor

4.6 Análise de citocinas das células ARPE-19 infectadas e não infectadas mediante fatores como antígenos e sobrenadante.

Analisando individualmente as amostras em relação às exposições, notamos influência da IL-2 nas amostras de ARPE-19 previamente infectadas, porém com baixa expressão de IL-10 e TNF-α. Os efeitos da IL-6 se mostraram mediano em relação ao controle, tanto paras amostras de ARPE-19 quanto para estas previamente infectadas.

Quadro 1 - *Heat Map* de citocinas dosadas em amostras de ARPE-19 saudáveis e infectadas, pela técnica de CBA®, e exibidas pelo método de análise do tamanho de efeito de cada citocina mediante exposição por parasita, sobrenadante, e antígeno obtido de parasita RH nos diferentes grupos (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2µg)

		IL-2		TNF-α		IL-10		IL-6	
		ARPE-19 S	ARPE-19	ARPE-19 S	ARPE-19	ARPE-19 S	ARPE-19	ARPE-19 S	ARPE-19
	Parasita	1,2838	0,8391	0	0,8164	0	0,8793	0,8165	0,8164
	Sobrenadante	1,2838	0,8672	0	0,8164	0	0,8793	0,8165	0,8164
	0,5 µg	1,2838	0,8774	0	0,8164	0	0,8793	0,8165	0,8164
	1 µg	1,035	1,2624	0	0,3495	0	0,8793	0,8165	0,8164
	2 µg	0,9979	0,8112	0	0,8164	0	0,8793	0,8165	0,6237
	0,25 µg	0,6928	0,5896	-0,8164	0,8164	0	0,7049	-1,1466	0,8164
	0,125 µg	0,9137	0,8515	0	0,8164	-0,8164	0,6762	0,8165	0,8164

1 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0 | -1

Fonte: Produção do próprio autor

4.7. Avaliação das citocinas obtidas de ARPE-19 infectadas e não infectadas associadas a célula RAW

As células RAW isoladas não apresentaram nenhuma resposta mediante a infecção pelo parasita *T. gondii*, porém o grupo controle também não apresentou resultados sensíveis quanto à expressão da citocinas alvo. As células ARPE-19 e ARPE-19 infectadas apresentaram produção baixa de citocina em relação ao grupo controle, com destaque para a ARPE-19 não infectada onde a IL-2 se mostrou presentes. No entanto, as IL-6, IL-10 e TNF-α apresentaram uma resposta superior ao grupo ARPE-19 não infectada em amostras isoladas.

As amostras obtidas da combinação de RAW e ARPE-19 apresentaram uma expressão maior na secreção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α, muito mais elevada em relação as amostras isoladas, com um efeito “grande” devido a presença do parasita, principalmente nos grupos que já foram previamente expostos ao parasita.

Quadro 2 - Apresentação das citocinas obtidas pela dosagem por CBA de amostras isoladas de RAW, ARPE-19 e ARPE-19 infectadas e suas combinações. Calculadas pelo efeito D de Cohen, gerando o quadro de *Size Effect*, Onde: <0,5 baixo; 0,5 <>0,8 médio; >0,8 alto; 0 nulo

		CONTROLE		PARASITA		Size Effect	D de Cohen
IL-6	RAW	0	0	0	0	0	NULO
	RAW + ARPE - 19	0	0,41	362,13	0,7	1	GRANDE
	RAW + ARPE - 19 S	5,46	3,31	841,97	1983,9	2	GRANDE
	ARPE - 19	0	1,88	0,6	0	0,6	MÉDIO
	ARPE - 19 S	0	0,11	2,28	0	0,9	GRANDE
IL-4	RAW	0	0	0	0	0	NULO
	RAW + ARPE - 19	0,53	1,4	0,95	1,29	0,33	BAIXO
	RAW + ARPE - 19 S	0,35	0	0	1,15	0,66	MÉDIO
	ARPE - 19	0,3	3,42	0	0	1,19	GRANDE
	ARPE - 19 S	0	0,39	0,76	0	0,4	BAIXO
IL-10	RAW	0	0	0	0	0	NULO
	RAW + ARPE - 19	1,61	0	343,35	247,53	6,14	GRANDE
	RAW + ARPE - 19 S	12,45	3,81	471,43	332,94	5,67	GRANDE
	ARPE - 19	0	17,74	1,61	0	0,9	GRANDE
	ARPE - 19 S	0	0	4,05	0	1	GRANDE
IL-2	RAW	0	0	0	0	0	NULO
	RAW + ARPE - 19	1,02	0,74	1,33	0,87	0,8	GRANDE
	RAW + ARPE - 19 S	0	1,08	1,38	0,72	0,8	GRANDE
	ARPE - 19	1,08	2,38	1,29	0,51	1,09	GRANDE
	ARPE - 19 S	0	1,73	0	0	1	GRANDE
TNF-α	RAW	0	0	0	0	0	NULO
	RAW + ARPE - 19	270,34	350,5	400,2	27,78	0,5	MÉDIO
	RAW + ARPE - 19 S	2423,33	2290,8	742,25	1152,0	6,5	GRANDE
	ARPE - 19	0	11,96	0	0	1	GRANDE
	ARPE - 19 S	5,79	0	1,88	0	0,64	MÉDIO

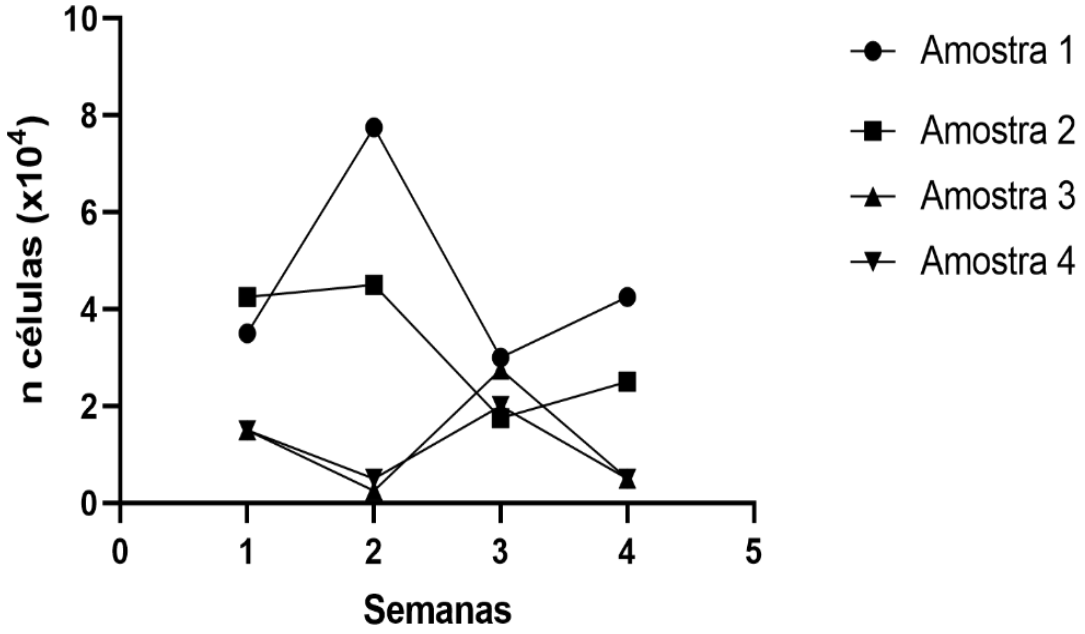
1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	-1

Fonte: Produção do próprio autor

4.8 Avaliação do isolamento de células do EPR de camundongos C57BL/J6

A avaliação das células isoladas dos olhos de camundongos C57BL/J6 demonstrou que as células primárias apresentam instabilidade quanto as suas passagens; detalhando para o experimento o uso das células até a segunda passagem.

Gráfico 12 - Número estimado de células isoladas do epitélio pigmentado da retina de animais C57BL/J6 após passagens semanais.

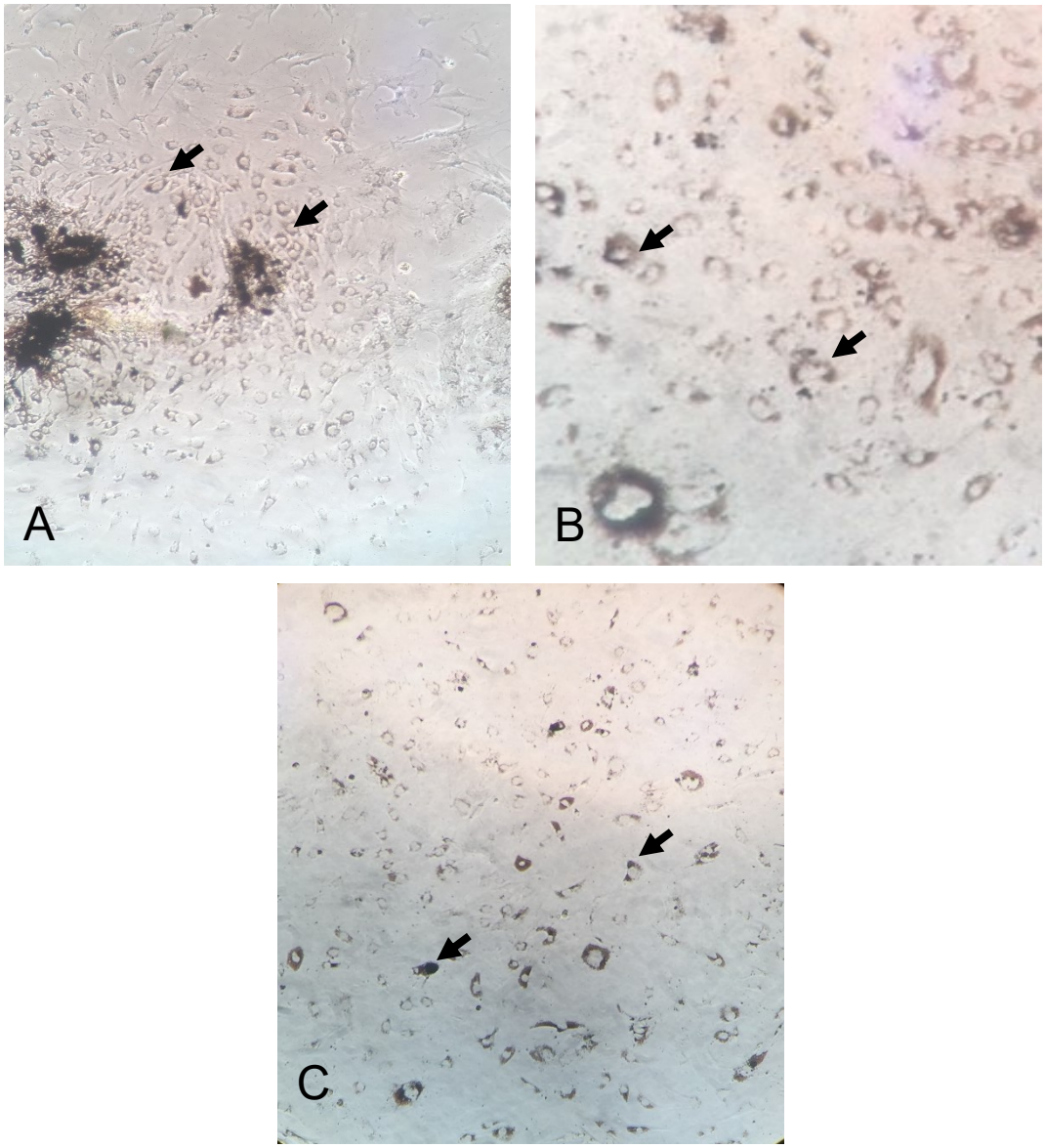


Fonte: Produção do próprio autor

4.9 Isolamento de células do epitélio pigmentado da retina de animais C57BL/J6

As células isoladas do EPR de camundongos C57BL/J6 se mostraram hiper pigmentadas nos nichos com células derivadas sem pigmentação, as células que surgiram posteriormente iniciaram a sua pigmentação após 2 dias de cultivo mantendo as características de epitélio pigmentado até a próxima passagem.

Figura 13 - Células isoladas do epitélio pigmentado de camundongos C57BL/J6, **A.** três dias de cultivo; **B.** 5 dias de cultivo; **C.** 7 dias de cultivo. (seta) indicando as células pigmentadas.



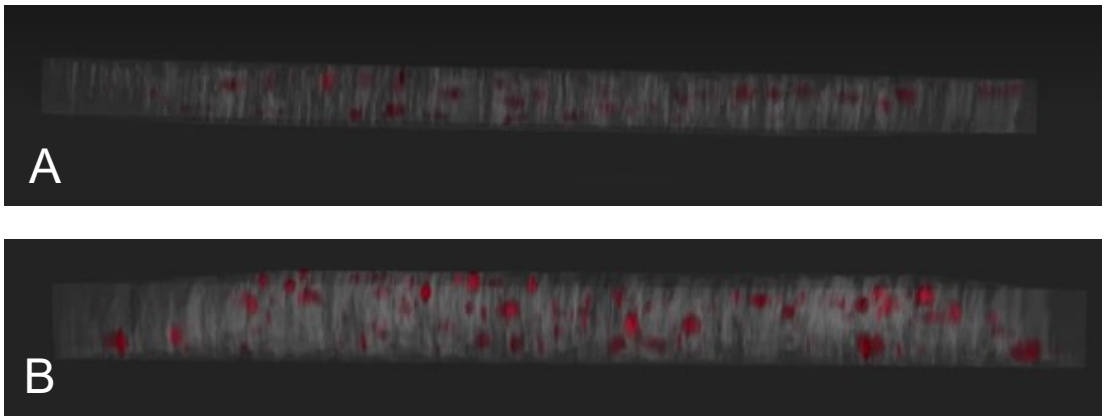
Fonte: Produção do próprio autor

4.10 Identificação da migração celular por microscopia

4.10.1 Microscopia Confocal

Utilizando o corante de violeta cristal 2%, foi capaz de identificar a posição do núcleo das células ARPE-19 cultivadas em membrana *transwell* e visualizar que o núcleo das células expostas que em um intervalo de 24 horas migraram mais rápido para a porção inferior da membrana, conforme Figura 14 B. O número de células no grupo controle (Figura 14 A) apresentaram maior proximidade da porção superior, local de cultivo das células, enquanto as células infectadas realizaram a migração para a porção inferior da membrana em maior quantidade.

Figura 14 - Posicionamento do núcleo de células ARPE-19 corados com violeta cristal 2%, **A.** Grupo controle; **B.** Grupo exposto ao parasita *T. gondii* da cepa RH. Aumento 10x.



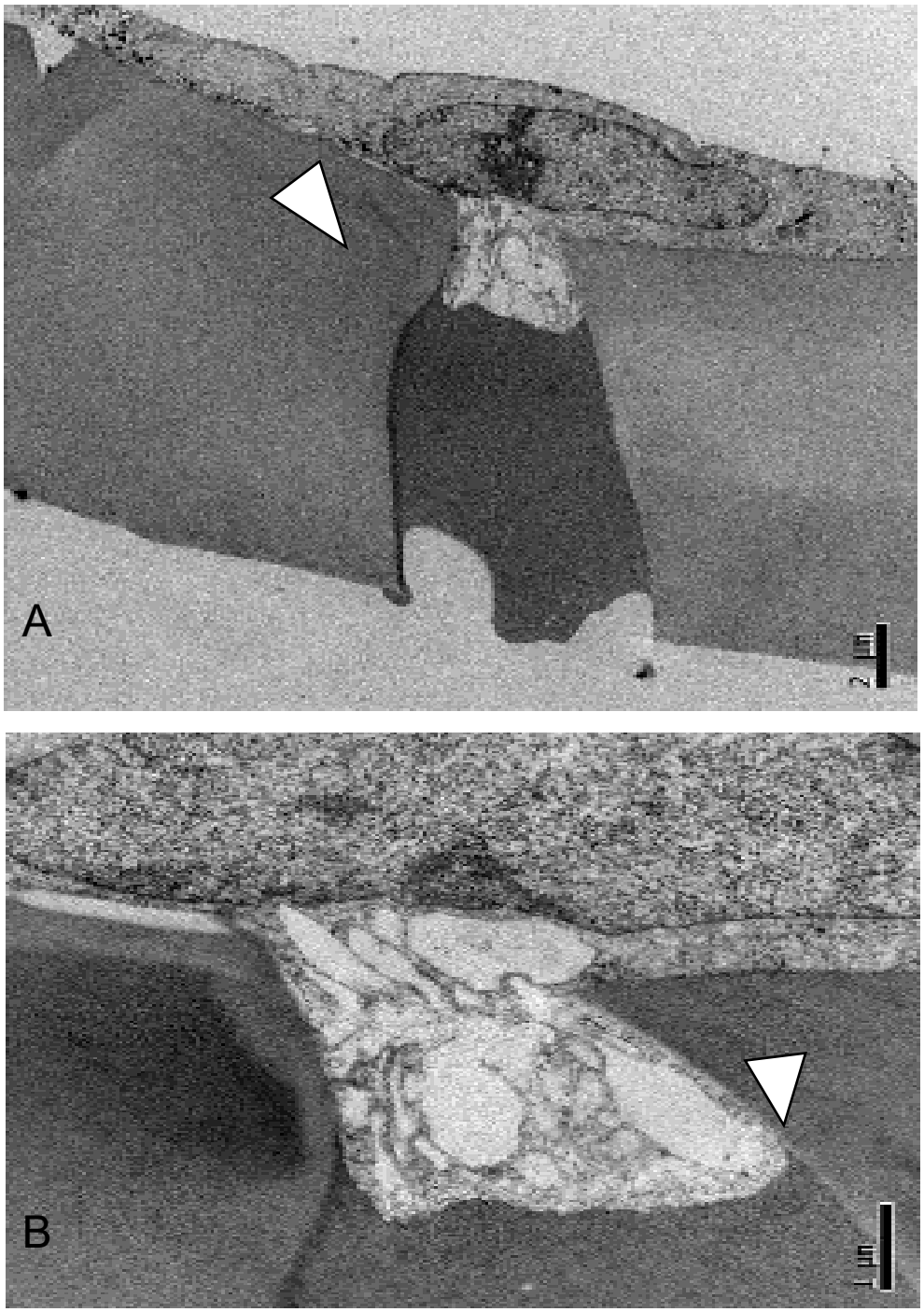
Fonte: Produção do próprio autor

4.10.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A célula isolada dos olhos de camundongos C57BL/J6 mantiveram suas características estruturais, como visto nas figuras 15 A e B. Quanto às células obtidas de camundongos saudáveis, observamos eventos migratórios no grupo basal (exposto a SFB), mas este evento se mostra deficitário, sendo necessário tempos de incubação maiores que 24 horas. De maneira que em um período de 24 horas as células tendem a passar direto sobre o poro, não internalizando-os. Já o grupo controle desafiados com o *T. gondii* apresentaram o mesmo comportamento, no entanto as amostras deste segundo grupo migraram com maior frequência em relação ao basal, conforme a Figura 16 A e B. As células obtidas de animais imunizados com antígeno *T. gondii* da cepa RH, os efeitos migratórios aumentam, sendo mais difícil localizar poros que não tenham partes da célula ultrapassando a membrana.

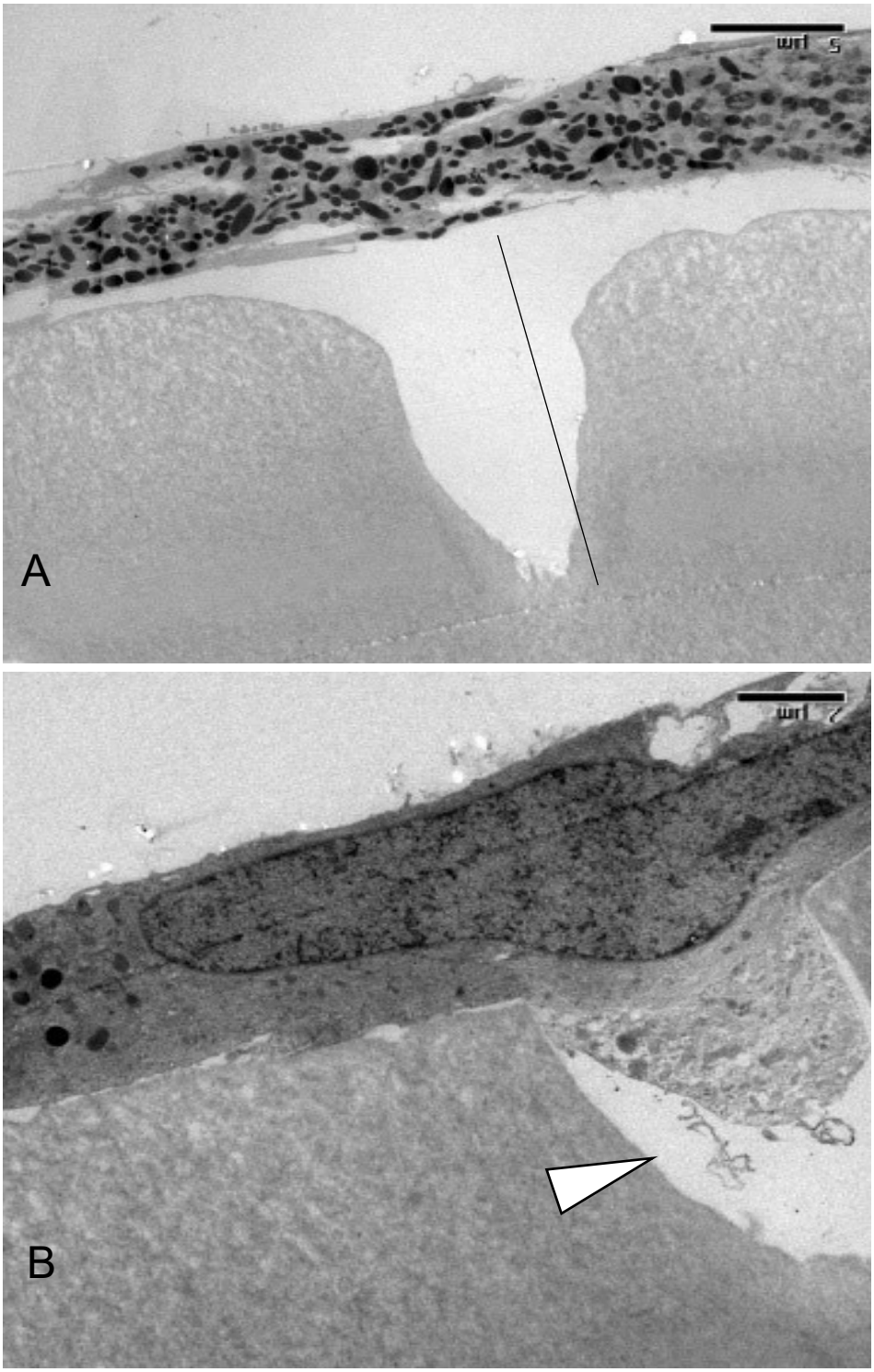
Já as células obtidas de animais imunizados, apresentaram maior migração em relação aos grupos anteriores, conforme Figura 17 A e B, na qual é possível identificar maior quantidade de poros preenchidos por partes da célula ou a célula inteira no interior do poro (Figura 17A). Similarmente, em relação as células obtidas de animais infectados, foi observado uma maior parte da célula no interior do poro, além de partes da célula na porção inferior da membrana, com uma taxia mais evidente em relação aos demais grupos Figura 18 A e B.

Figura 15 - Identificação dos poros com partes da célula EPR isoladas de camundongos C57BL/J6, onde (contorno de seta) indica partes da célula dentro do poro da membrana. **A** e **B.** (Grupo Basal) Célula isolada de camundongo C57BL/j6 saudável exposto a SFB para controle interno do experimento.



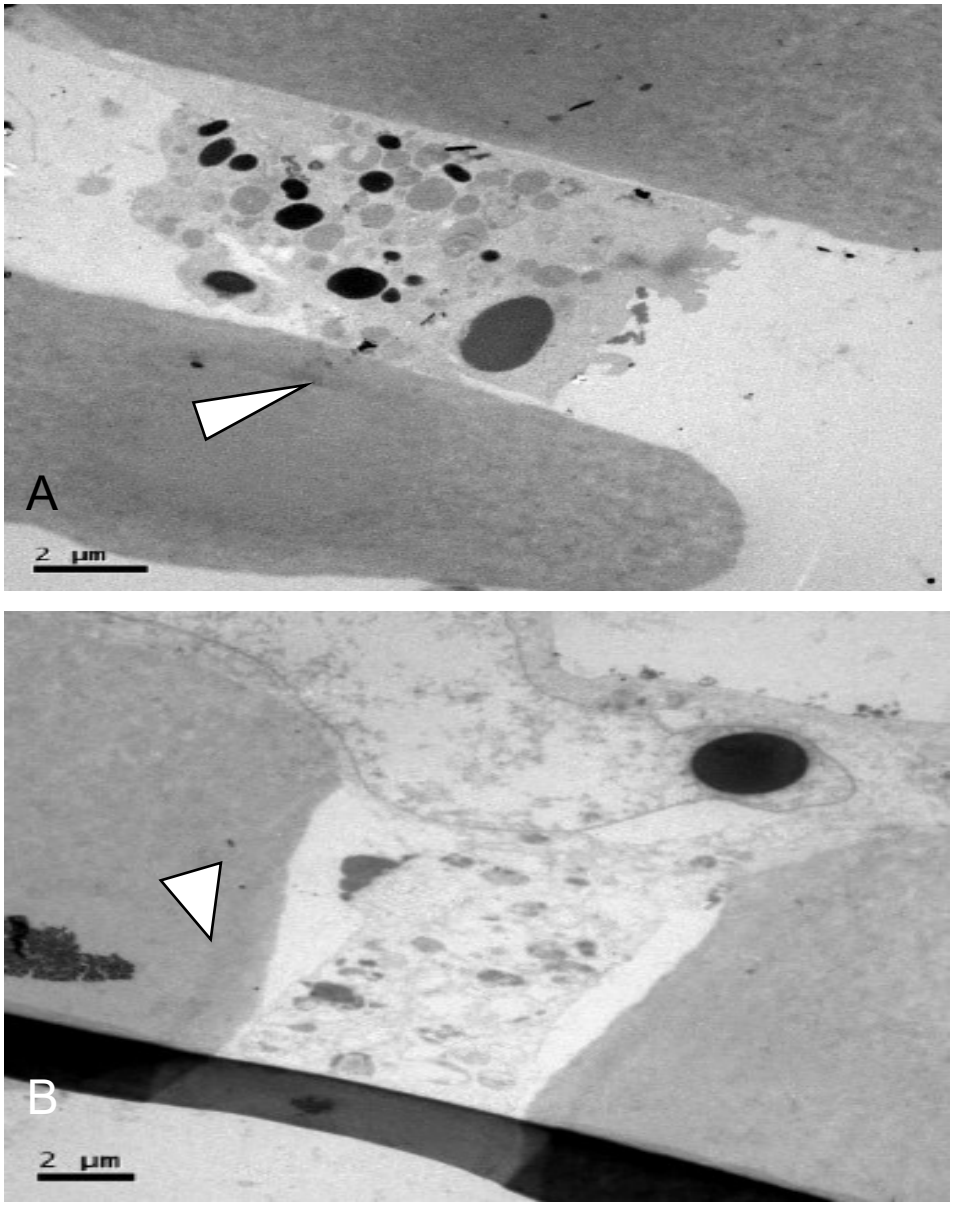
Fonte: Produção do próprio autor

Figura 16 – Célula isolada de camundongos C57BL/j6 controle exposto ao *T. gondii* ME-49; **A.** Célula sobre a membrana do *transwell* sobre o poro, não realizando a migração para a porção inferior. **B.** Migração lenta da célula para o interior do poro, sem adesão as paredes do poro.



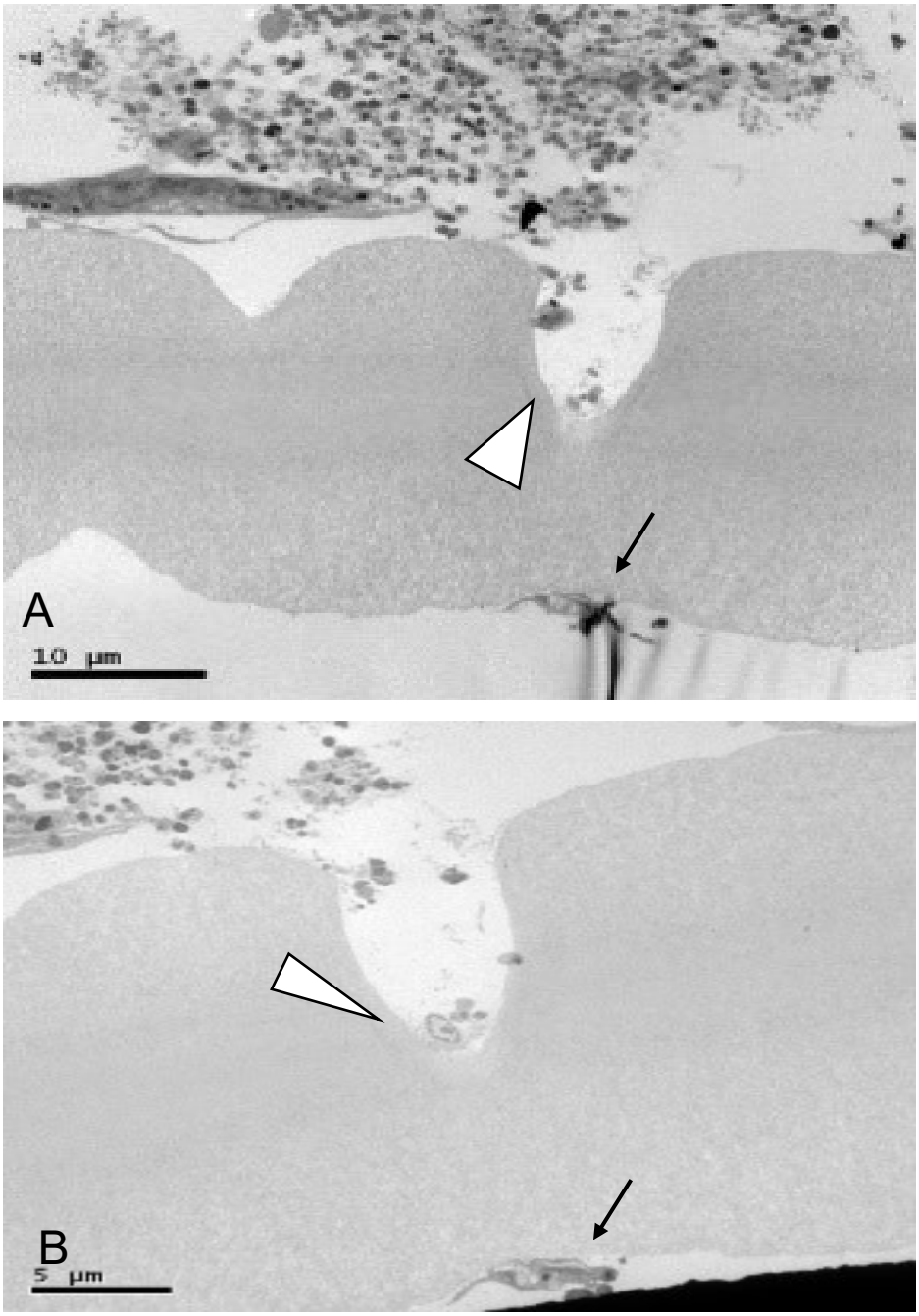
Fonte: Produção do próprio autor

Figura 17 - A e B Célula isolada de camundongos C57BL/J6 imunizado (30 dias) com a cepa RH, (contorno de seta) indica célula dentro do poro



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 18 – A e B Célula isolada de camundongos C57BL/J6 infectados com *T. gondii* ME-49 (45 dias), onde contorno de seta indica partes da célula adentrando o poro da membrana, e seta indica porção basal da célula que ultrapassou a membrana

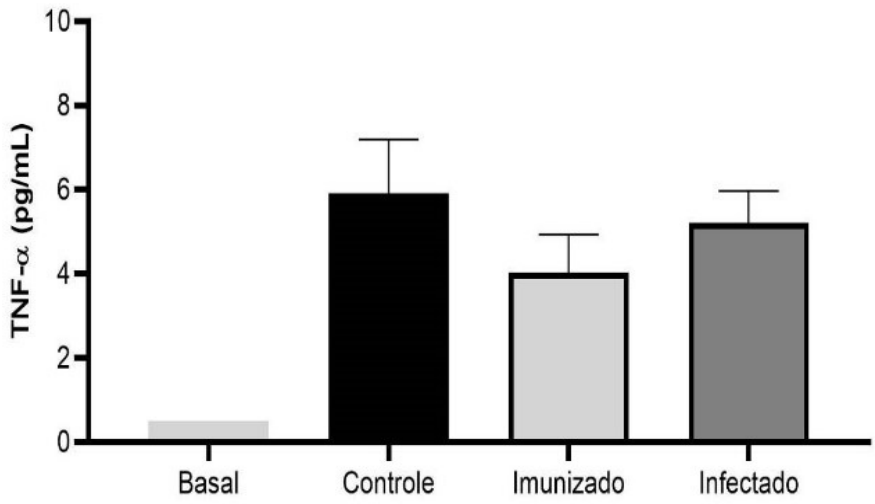


Fonte: Produção do próprio autor

4.11 Dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17 produzidas pelas células do epitélio pigmentado da retina in vitro de células isoladas

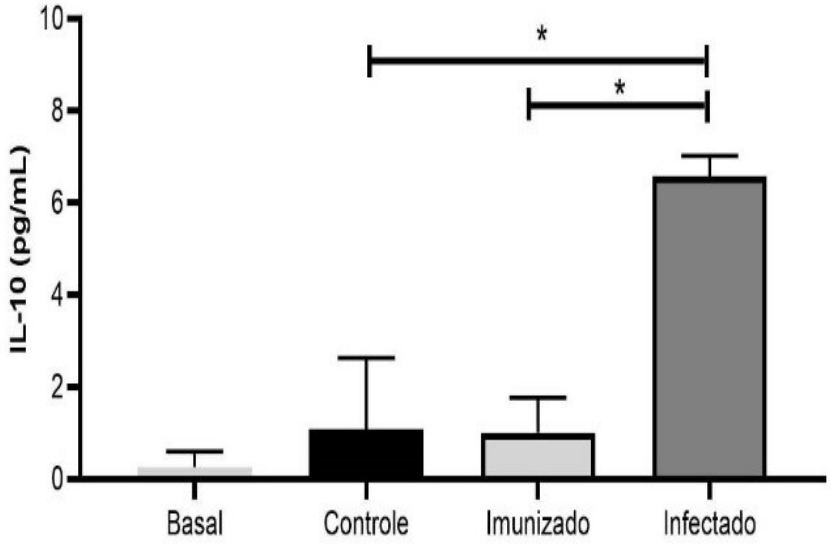
Ao analisarmos os níveis de citocinas dosados pelo kit CBA®, três citocinas se destacaram, sendo elas, IL-6, IL-10 e a TNF-α, com um aumento expressivo nos grupos desafiados com ME-49. No gráfico 3 observou-se uma expressão maior do grupo controle (788,36pg/ml) em relação ao grupo imunizado (414,09pg/ml) e infectado (153,14pg/ml) com significância estatística, delineando um perfil inflamatório para as células infectadas sem contato prévio tanto com o antígeno quanto com o parasita. No entanto, o grupo imunizado apresentou resultados intermediários aos demais grupos. A IL-10 de caráter pró resolutivo, comportou-se de maneira opositora a IL-6, com maior relevância no grupo infectado (6,58pg/ml). Já a TNF-α destacou-se no grupo controle (5,92pg/ml), devido ao seu caráter inflamatório, mas manteve-se estável, apresentando relação com a migração da célula do EPR.

Gráfico 13 - Nível de TNF-α pós desafio com *T. gondii* ME-49; onde Basal refere-se a secreção normal de TNF-α pela célula, Controle obtido de células do EPR isoladas de animais saudáveis; imunizado, células isoladas de animais imunizados com 3 doses de ME-49 irradiado a 255Gy (3.10^6 parasita/ ml). Infectado, obtido de células isoladas de animais infectados com dose única de taquizoitos de ME-49.



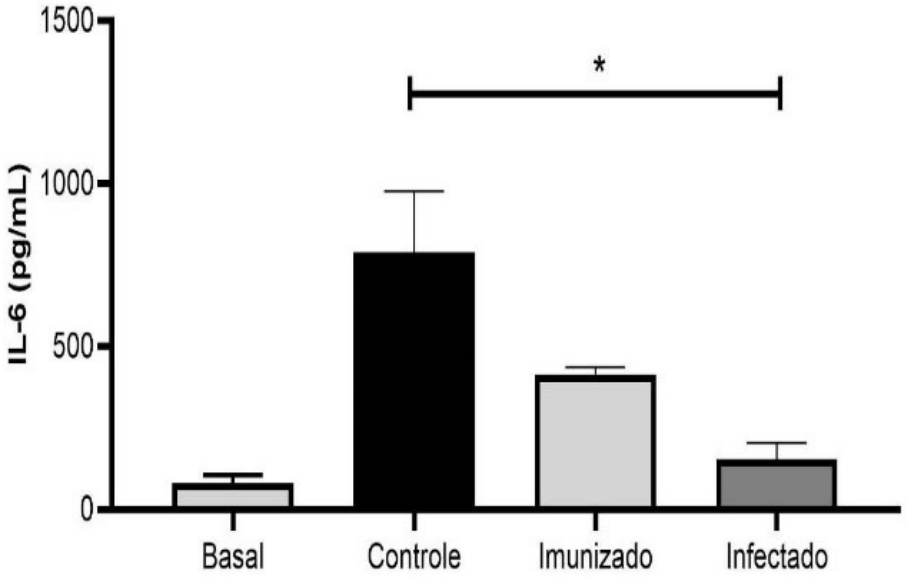
Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 14 - Nível de IL-10 pós desafio com *T. gondii* ME-49; onde Basal refere-se à secreção normal de IL-10 pela célula, Controle obtido de células do EPR isoladas de animais saudáveis; imunizado, células isoladas de animais imunizados com 3 doses de ME-49 irradiado a 255Gy (3.10^6 parasita/ ml). Infectado, obtido de células isoladas de animais infectados com dose única de taquizoitos de ME-49.



Fonte: Produção do próprio autor

Gráfico 15 - Nível de IL-6 pós desafio com *T. gondii* ME-49; onde Basal refere-se à secreção normal de IL-6 pela célula, Controle obtido de células do EPR isoladas de animais saudáveis; imunizado, células isoladas de animais imunizados com 3 doses de ME-49 irradiado a 255Gy (3.10^6 parasita/ ml). Infectado, obtido de células isoladas de animais infectados com dose única de taquizoitos de ME-49.



Fonte: Produção do próprio autor

5 DISCUSSÃO

Atualmente muito se sabe a respeito da fisiologia das células do epitélio pigmentado da retina, mas quando sob circunstâncias de infecção pelo *Toxoplasma gondii*, encontramos diversas lacunas referentes a interação destas células mediante o patógeno agressor, como os mecanismos que a célula do EPR utiliza para a defesa da estrutura ocular. E a partir de ensaios de migração *in vitro* com as células isoladas ou linhagens celulares podemos iniciar esta trajetória com destino ao entendimento deste fenômeno até a possível resolução do problema que é a infecção e as lesões do bulbo do olho.

A ARPE-19 é uma linhagem de célula de crescimento rápido, espontâneo, purificada de cultura primária. As suas principais características são bordas bem definidas, de formato geral cuboide e pigmentação presente. A diferenciação leva em torno de 3 a 4 semanas após a primeira confluência. O pigmento continua acumulando tornando a célula cada vez mais negra. Mas, apesar de algumas linhagens terem sido estabelecidas para o tecido epitelial da retina, os níveis de sódio (Na), potássio (K), ATPase e algumas citocinas são diferentes das dosadas *in vivo* [9]. Esse fato, provavelmente, se dá devido à ausência de interação com a matriz celular e as demais células que circundam o tecido epitelial da retina, uma limitação dos procedimentos *in vitro*.

Nosso desenho experimental utilizou essa linhagem comparada com as linhagens primárias obtidas dos olhos de camundongo C57BL/J6, porém devido a perda de características especificas das células isoladas após a terceira passagem, optamos por dar sequência aos nossos estudos com as células primárias até a segunda passagem apenas. As células do EPR tendem a manter a funcionalidade preservada, incluindo a habilidade de transporte, fagocitose dos segmentos dos fotorreceptores e algumas partículas virais. No entanto, a obtenção é dificultada e requer purificação para estabelecer uma população uniforme, além da variabilidade do doador [9], necessitando o uso de culturas já pré-determinadas como a célula ARPE-19.

DUNN relata em seu estudo que a linhagem ARPE-19 não é uma linhagem imortalizada e é capaz de chegar a senescência, se mostra ótima para estudos de

avaliação do metabolismo, o que as torna ideais para o nosso desenho experimental, uma vez que avaliamos a migração e comunicação entre parasita e “hospedeiro”.

Nosso objetivo foi analisar a capacidade da ARPE-19 em responder aos estímulos gerados da interação com o *Toxoplasma gondii* em comparação a situações de homeostasia.

Ao utilizarmos meio de cultura não suplementado, foi possível de identificar um aumento no número de células que migraram pelos poros da membrana *transwell* nas amostras contendo o parasita, nesse sentido, nossos achados corroboram com os achados de Dunn *et al*. [9], principalmente no que tange a capacidade migratória da célula se manter preservada e com polaridade, uma vez que o estímulo pela porção basal, seja capaz de induzir a migração para a porção inferior do *transwell*. Porém apenas a observação da migração, é apenas um indício, para afirmarmos que o evento migratório ocorre por estímulo do parasita, mesmo que o número de poros preenchidos nas amostras estimuladas com o *T. gondii*, tenham sido superiores ao grupo controle.

Para confirmar o achado, foi necessário a realização de dosagens séricas avaliando os perfis Th1, Th2 e Th17, no entanto os dados obtidos das dosagens de citocina não foram conclusivas, pois as citocinas que poderiam estar relacionadas ao efeito migratório do EPR, não apresentavam uma linha de expressão lógica, conforme os achados de Shen Ye *et al*. [42] e Elner *et al*. [61] que mostram que a expressão de IL-6 e TNF-α, tem ação responsiva a agentes patogênicos e estresse do microambiente, respectivamente.

Nesse sentido, três hipóteses foram elocubradas, sendo elas: (1) A migração ter ocorrido, pela ação da gravidade auxiliando nesta migração. Esta hipótese poderia ter relação direta quanto a polaridade das células, já descrita por Dunn *et al*.[9] ao verificar a posição dos núcleos basais e a distribuição das organelas; (2) a resposta realizada pelo parasita é de intensidade suficiente para realizar a migração (3) há a possibilidade de outras estruturas estarem envolvidas na comunicação e respostas de migração efetiva do EPR.

A nossa terceira hipótese poderia ser facilmente respondida, se levarmos em consideração que a célula fora do organismo vivo, sem as interações que é habituada a realizar possa responder de forma menos efetiva a citocinas, indo de acordo com os

achados de Garweg *et al*. [45], que, afirma que a resposta ocular inflamatória é mediada primariamente pelos CD4(+), podendo haver envolvimento das CD8(+) e linfócitos B, que são responsáveis por dificultar o crescimento parasitário local, entretanto, em nossos experimentos foi possível observar que existe migração. Estes achados nos sugerem fortemente que o limite de detecção do método empregado é inferior aos níveis de citocinas e interleucinas secretados *in vivo*.

A fim de confirmar nossos achados, utilizamos o modelo experimental proposto por Heit e Kubes [59] que relatam que há diversas maneiras de se realizar o estímulo, optamos por fazer sempre os estímulos com um controle negativo, que foi padronizado sempre ao lado esquerdo da célula e no lado oposto os estímulos alvo. Os parâmetros avaliados foram a distância percorrida em 24 horas e o número de células que realizaram esta migração. Os achados de Heit e Kubes [59], em modelo que utilizou neutrófilos. O período de 3 a 4 horas foi suficiente para ter o evento migratório, do *well* cultivado até o *well* com o estímulo alvo, no entanto, neutrófilos são células capazes de migrar por si, enquanto células do EPR são células que formam barreira, não havendo “necessidade” de realizar a migração a grandes distancias. Se fazendo necessário a investigação por maiores períodos

Nossos achados evidenciaram que as células do EPR, mesmo com o estímulo, não realizaram uma migração suficiente, dentro do período de 24 horas com exceção a poucas amostras, para chegar ao local do estímulo alvo, porém quando calculado a diferença entre o *well* controle com o *well* estimulado, foi possível identificar dentro do N amostral uma migração em maior quantidade para o lado alvo, porém não superior ao controle em distância. Nesse sentido pudemos concluir que nas amostras de *transwell* obtivemos um número maior de células dentro do poro da membrana nos grupos estimulados por parasita, porém, nas amostras *underwell,* a célula não realizou a mesma migração.

Para tanto, foi preciso de uma nova técnica para marcar o parasita ou um parasita que apresentasse marcação visual distinta das células. Nesse experimento foi utilizado o *T. gondii* YFP cedido pelo grupo de pesquisa da profa. Dra. Karina Bortoluci (UNIFESP) e obtivemos achados, que evidenciaram que não houve a migração da célula ARPE-19 em direção ao parasita, porém, o parasita foi capaz de realizar esta migração por baixo do ágar. Mostrando que esta técnica não foi eficaz para a identificação da migração da célula em relação ao *T. gondii*.

Diante deste problema optamos por utilizar o sobrenadante metabolizado de culturas de ARPE-19 infectados com o *T. gondii*, dessa forma poderíamos ter os estímulos necessários para a indução migratória da célula ARPE-19, eliminando a migração do parasita. Como proposto por Heit e Kubes [59], ao utilizar estímulos diretos.

Ao realizarmos esse experimento, não evidenciamos migração ou efeitos diferentes dos obtidos anteriormente, nesse sentido, recorremos ao uso de um antígeno para verificarmos se existia efeitos migratórios, já observados nas membranas de *transwell.*

Para realizarmos esse ensaio, utilizamos os antígenos presentes na biblioteca criopreservada do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP (IMT-FMUSP), uma vez que as proteínas provenientes da maceração do parasita ainda apresentam a capacidade de antigenicidade [20,35]. Foi realizada uma etapa para determinar a concentração de proteínas a ser utilizada nesse ensaio, para tanto, utilizamos três dosagens inicialmente (antígeno diluído a 2 µg/ml, 1 µg/ml e 0,5 µg/ml), e obtivemos os seguintes resultados em relação aos grupos experimentais:

1- As distâncias percorridas pela célula ARPE-19 eram difusas, porém com maiores tendências nos grupos com menores concentrações do antígeno (0,5 µg/ml).
2- Seguido de uma maior migração pelo grupo de 1 µg/ml,
3- Baixíssima migração do grupo com 2 µg/ml.

O número de células migradas manteve-se aproximadamente constante durante todos os experimentos, evidenciando que existe um padrão de migração dose-dependente, como já discutido por Passos *et al*. [43], Barbosa *et al*. [44] e Choi *et al*. [62].

Outro experimento realizado foi a identificação de citocinas responsáveis por esta comunicação. Mas os dados mostraram achados inferiores a 1 pg/ml de todas as citocinas dosadas, desta maneira, mesmo evidenciando os eventos migratórios, não conseguimos verificar qual a via de sinalização molecular estaria envolvida nesse evento.

De acordo com os achados anteriores repetimos os experimentos com concentrações menores de antígeno (0,25 µg/ml e 0,125 µg/ml), nesse ensaio, foi revelado que os eventos migratórios se concentraram da mesma maneira que os resultados anteriores, porém a quantificação que realizamos mostraram níveis de IL-

2 (1,41 pg/ml) e IL-10 (3,41 pg/ml) sugerindo uma resposta anti-inflamatória, corroborando com Calabrese *et al*. [63] que mostrou em seus estudos que a IL-10 tem por finalidade o balanceamento entre a imunidade protetiva e o desenvolvimento da imunidade patológica, entretanto, Hooks *et al*. [64] relata em seus achados que a IL-2 é produzida principalmente por linfócitos T e pode ser ativado pelas células NK. O que nos sugere que a célula ARPE-19 tem potencial de reconhecimento, estruturação e ação da resposta imune.

Outro parâmetro avaliado foi o poder de resposta da célula ARPE-19 sobre a infecção, nesse sentido, verificamos que independentemente do estímulo ou da condição celular o número de células migradas não se alteraram entre os grupos. Ashander *et al*. [39], observaram que em neutrófilos infectados ocorre uma diminuição considerável na atividade migratória. Principalmente quanto a presença dos receptores de motilidade CXCL1, CXCL 2 ou CXCL 8, como uma maneira defensiva do organismo diminuir a possibilidade de o parasita encontrar outros neutrófilos saudáveis.

Apesar de o neutrófilo ter sido retardado nestes estudos, não significa que extingue a possível infecção, apenas diminuindo a possibilidade. O que pode estar associado ao fato de a doença ser infimamente bilateral dentro da população de doentes. Pois esta é uma das vias pela qual o parasita se desloca dentro do organismo [17].

Thiemi *et al*. [65] relatam que os pacientes de toxoplasmose ocular infectados primariamente sofrem de uma resposta inflamatória maior que os portadores recorrentes, e que os mediadores imunológicos reduzem conforme o número de reinfecções. Por outro lado o *T. gondii* induz uma grande resposta imunológica atraindo precocemente muitos neutrófilos, o que para a resposta imune adaptativa é importante, não havendo uma super estimulação do sistema imunológico [41]. Assim sendo a comparação destes dois grupos nos resultaria em uma única alternativa, ou o contato prévio *in vitro* nos originaria um domínio da resposta imunológica ou a sua exacerbação. Choi *et al*. [62] demonstraram que o *T. gondii* é capaz de modular as células do epitélio pigmentado tal como inibir a apoptose, protegendo-a do estresse oxidativo. Já que a apoptose é um dos principais mecanismos de defesas contra patógenos intracelulares do EPR. Além disso, o *T. gondii* também é capaz de modular este evento para o benefício de sua própria sobrevida, a partir da supressão de ROS,

e Fas/ FasL. No entanto, nossos experimentos demonstram uma desregulação dos estímulos nos grupos previamente infectados, mesmo que em relação ao evento migratório não tenha sido observado nenhuma diferença, nem em relação a distância percorrida, nem quanto ao número de células. Os níveis de citocinas se mostraram inferiores aos observados nos grupos saudáveis, sugerindo a modulação imunológica proposta por Choi *et al*. [62] e Thiemi *et al*. [65].

Realizamos ainda experimentos com células RAW 264.7 bem como os experimentos de Shirasawa *et al*. [66,] Yamawaki *et al*. [67], como uma forma de identificar a importância da comunicação celular, e provavelmente aumentando o efeito de migração, e, apesar dos eventos migratórios não terem sido diferentes dos anteriores, as expressões de citocinas se mostraram mais favoráveis, uma vez que Zhou *et al*. [17] descreveram uma diminuição do evento migratório deste grupo celular.

Esses achados nos sugerem que a comunicação com o *T. gondii* especificamente, bloqueia esta migração numa tentativa de inibir a disseminação do parasita e corroboram com os achados de Ashander *et al*. [39], reforçando ainda mais a ideia de que o parasita seja capaz de modular imunologicamente esta resposta. Além do mais, as nossas dosagens demonstram que a comunicação desta combinação celular é exacerbada. Com destaque para as IL-6 e IL-10.

Elner *et al*. [61] exaltam a importância da IL-6 com um papel importante na toxoplasmose ocular, tanto para fins de inflamação quanto na reparação tecidual, enquanto a IL-10 apresenta um papel importante na inibição da resposta pró-inflamatória controlando os danos teciduais [41].

Apesar desta modulação ter como finalidade a proteção e manutenção da homeostasia tecidual [33], um desbalanço da IL-6 através do receptor gp130 pode tornar a IL-6 mais patológica do que protetiva [58], fazendo necessário a contrarresposta das demais interleucinas.

Torres-Morales *et al*. [66], mostram que os níveis de IL-10 sempre estiveram abaixo dos níveis de 20 pg/ml, porém, nos nossos grupos de associação entre ARPE-19 e RAW 264.7 estes resultados aumentaram na ordem de 100x, enquanto para a IL-6 estes níveis aumentaram na escala de nanogramas para microgramas, divergindo dos achados de Silva *et al*. [6], que não obteve resultados significativos quanto a

expressão de IL-6, mas os níveis de IL-10, TNF-α e iNOS exacerbaram quanto aos estímulos causado por extra vesículas do *T. gondii*.

Apesar de não termos realizado as dosagens de iNOS, esta apresenta alta relação com os níveis de IL-10. Enquanto, a IL-6 tem como um dos papeis principais ser responsável pela formação de células T(H)-17 a partir de células *naïve* [43].

A IL-10 tem a função de realizar um balanceamento entre as respostas patológicas das células T e os seus efeitos protetivos, como uma maneira de não exacerbar a resposta inflamatória, garantindo assim a sobrevida do hospedeiro, podendo ser produzida por diversos tipos celulares, induzida pela IL-6 ou IL-27 [45], contudo, não obtivemos níveis significativos da IL-17A que apresenta relação direta com a IL-27. Mas a certo modo, os níveis de IL-10 podem ter sido expressos devido aos estímulos da IL-6. Ressaltamos que em estudo anterior, a expressão de IL-17 [65] pode variar conforme a etnia, entre os perfis Th1 e Th17 ou Th2, nos propondo que esta disparidade torna ainda mais desafiante a identificação de um único parâmetro definidor para a infecção do *T. gondii* na estrutura ocular.

É importante entender que apesar da interação RAW 264.7 e ARPE-19 ter promovido uma resposta intensa, a RAW 264.6 isolada não apresentou efeito algum quanto a presença do parasita. E a ARPE-19 isolada apresentou níveis baixos, como já descrito por Torres-Morales *et al*. [66]. Porém a ARPE-19 infectada apresentou uma resposta 4x mais efetiva na produção da IL-6 e IL-10, quando comparada a célula ARPE-19 saudável.

Os experimentos de Ashander *et al*. [39] demonstram uma produção aumentada de ROS, IL-1β e TNF-α, quando comparados a cultura de retina pura. Relatando que o EPR infectado pelo *T. gondii* é capaz de expressar múltiplas citocinas que possam promover a ativação de neutrófilos, como GM-CSF, IL-6 e IL-18.

Alguns tipos celulares podem estar mais propensos que outros na produção de determinadas citocinas. Por fim, Ashander *et al*. [39] sugerem que os neutrófilos só entrem no tecido retiniano pós infecção, e Zhou *et al*. [17] detalha em seus experimentos a ação de macrófagos, no qual macrófagos M1 estão geralmente presente nas regiões próximas a neovascularização enquanto M2 está nas camadas mais internas da retina, levando em consideração que M2 são macrófagos com perfil mais angiogênico,

enquanto os M1 são células pro inflamatórias, de ação mais efetora na destruição de células tumorais e organismos estranhos.

Assim, ressaltamos que há a migração das células da porção mais interna para a porção corioideana, também como uma forma de suporte da micróglia em casos de neovascularização. Podendo nos induzir a crer que apesar disto, o EPR tenha uma grande responsabilidade nestes eventos de invasão do tecido ocular.

Por fim, a resposta da ARPE-19 mediante a presença do parasita, os antígenos expressos em suas proteínas ou o sobrenadante resultante da infecção, nos trazem informações para o entendimento de como este mecanismo ocorre nas células primárias, compreendendo se os efeitos são similares aos obtidos nas linhagens.

Os resultados obtidos com a ARPE-19 se mostraram muito inferiores aos resultados obtidos em culturas primárias, como já exposto por Shirasawa *et al*. [66,] Yamawaki *et al*. [67]. Os efeitos migratórios mantiveram-se o mesmo observado anteriormente com a linhagem celular, com aumento de células encontradas nos poros do *transwell*, mas o nível das citocinas dosadas se mostrou muito mais “estável”, diferindo de Rudizinski *et al*. [40]. Onde em nossos resultados se concentraram na expressão de TNF-α, enquanto, Rudizinski *et al*. [40] descreve em estudos com camundongos, altos níveis de IFN-γ no humor aquosos. Essa divergência pode estar relacionada com o fato de termos dosado estas citocinas apenas no sobrenadante, contendo os metabólitos da interação entre parasita e célula isolada, não possuindo um valor de referência ou um *cut-off* bem determinado pela escolha do modelo que optamos por utilizar.

Silva *et al*. [6] e Calabrese *et al*. [63] detalham a ação e importância do TNF-α em níveis elevados no controle da doença ocular aguda, associado a baixos níveis de IFN-γ, assim como Thiemi *et al*. [65], relacionado ao aumento nos níveis de IL-6. Estas citocinas têm como papel principal a morte do parasita, a resposta no papel sinergético do processo inflamatório e o controle do IFN-γ, corroborando com Garweg *et al*. [45] que descreve que ao utilizar o TNF-α recombinante como forma de tratamento de células da micróglia, é identificado um efeito toxoplasmastático, levando a destruição dos parasitas intracelulares, e concomitante liberação de IL-1β, IL-3 e IL-6.

Meira *et al*. [18] mostram que amostras humanas apresentam a concentração de TNF-α em escala de nanogramas, diferindo das nossas amostras que se mostraram

na faixa de pg/ml. Segundo Meira *et al*. [18], os níveis de TNF-α aumentam significativamente quando dosado em pacientes portadores de toxoplasmose ocular, como um parâmetro a ser considerado, mediante os efeitos da doença. Porém para nós, este efeito se mostrou similar em todos os grupos, levando-nos a crer apenas no seu potencial de ação para o controle da doença.

Para Zhou *et al*. [31] a IL-10 é o fator que possibilita o contrabalanceamento da produção de IL-4 e IL-13, a partir da atuação sobre a Arginase-1. No entanto a IL-10 estimula a proliferação do parasita, e devido a esta fundamental ocorrência o *T. gondii* é capaz de modular de maneira geral a estrutura celular, para o seu próprio benefício. Meira *et al*. [18] descrevem tal finalidade ao comparar pacientes de toxoplasmose ocular, crônica e cerebral crônica a pacientes saudáveis.

Segundo Garweg *et al*. [45] as cepas do parasita genotipadas de humanos se caracterizam pela baixa produção de IL-10 podendo ser tendenciosa ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular. Nos dando a entender que a IL-10 produzida seja originária das células hospedeiras. Além de desviar a resposta inflamatória para um perfil Th2, já proposto por Silva *et al*. [6].

Este fenômeno também é descrito por Huang Si *et al*. [69] onde os grupos imunizados apresentaram um perfil CD4+ maior que CD8+ apesar dos dois estarem aumentados, com aumento expressivo na produção de IL-10, associada a IL-12 e IFN-γ, sugerindo uma necessidade da dosagem de outros fatores como a IL-12, dentre outras que complementariam os nossos achados, pois apesar de termos realizado a identificação de fatores importantes já descritos na literatura, assim como muitos outros, Calabrese *et al*. [63] relatam a capacidade de a IL-10 inibir a secreção de IL-12, que é fundamental na infecção do *T. gondii* quando na ausência da IL-10.

Outro ponto interessante que deve ser levado em consideração, foi quanto ao uso de animais *knockout* para IL-10, nos achados de Calabrese *et al*. [63], que detalha que as lesões oculares são severas, e ressalta a importância da IL-6 no controle da patogenia. Porém nos animais previamente infectados a expressão desta citocina se mostrou diminuta em relação ao grupo saudável exposto ao desafio com o *T. gondii*. Diferindo de nossos resultados, onde o grupo infectado apresentou uma resposta mais rápida na produção desta citocina.

Em 1998 acreditava-se que o IFN-γ era uma das citocinas mais importantes na facilitação imunológica, devido ao seu potencial [64]. Outra vez que o EPR está frequentemente em contato com agentes patogênicos como principal alvo, o IFN-γ é fundamental para a resposta da imunidade adaptativa e inata [33]. Para tanto, nós não obtivemos resultados eficientes de sua aparição. Mas segundo Rochet *et al*. [58] e Torres-Morales *et al*. [66], o IFN-γ é altamente regulado nos modelos de C57BL/6, com função primordial nos casos de doenças oculares primaria, mas continuamente se torna expressa nos casos de agravamento da patologia, e controlada pela IL-6 e IL-12/23 p40 por *feedback* negativo ou a sua diminuição espontânea. Hooks *et al*. [64] reportaram apenas 4 casos, no qual houve apresentação desta citocina, mas estava associado a outras comorbidades. Apesar de uma grande gama da literatura relacionar a resposta primária ao IFN-γ [28,33,64], por causa dos grânulos densos produzidos pelo *T. gondii* que estimulam determinados epítopos à produção do IFN-γ, numa tentativa de reprimir a replicação do parasita e a migração monocitária.

Nós obtivemos pouca expressão (<1 pg/ml) ou nenhuma expressão desta citocina, justificado ao fato desta interleucina ser espontaneamente secretada por células periféricas do sangue no caso da toxoplasmose ocular [66] e as células NK [36,43], as quais não estavam presentes em nosso estudo. Em acréscimo Passos *et al*. [43], destacam a importância das células acessórias na produção de citocina, mas eleva o fato de que o fator mais importante é a secreção de IL-6, enquanto a IL-2 tenha seu efeito supressor de maneira dose dependente. Corroborando com os nossos achados, afinal os níveis de IL-6 foram os mais proeminentes, enquanto a IL-2 apareceu em raros casos, e geralmente associada a IL-4, onde temos a diminuição da IL-17 [45]. Garweg *et al*. [45] ainda relatam que em pacientes humanos de toxoplasmose ocular, os níveis de IL-6 são altos no humor aquoso, mas não no soro. Já na toxoplasmose ocular tardia, os níveis de IFN-γ e IL-10 são elevados em 50% dos casos, e IL-2 raramente encontrada. Podendo justificar ausência de IFN-γ e IL-2.

A IL-4 é secretada por um grupo seleto de células, especialmente por linfócitos CD4+ tipo II, mas não é capaz de afetar o crescimento intracelular do parasita. A secreção de IL-4 foi diminuta e restrita a poucas amostras assim como nos estudos de Calabrese *et al*. [63] e Huang Si *et al*. [69], porém não apresentando níveis significantes, e o enfoque acabou por se dar sobre a secreção de TNF-α para o controle da infecção pelo *T. gondii*,

Assim como para Hiramoto *et al*. [20] o nível de TNF-α é produzida similarmente aos animais infectados cronicamente. Mas a IL-10 apresentou níveis diferentes entre os grupos, discrepando do proposto por Hiramoto *et al*. [20]. Por outro lado, o autor alega aumento de IL-6 e IL-17A, não condizente aos nossos achados, mas similar a Sauer *et al*. [41] e Barbosa *et al*. [44]. Para o atual estudo, não consideramos a IL-17A, pois esta apresenta uma finalidade ambígua, uma vez que ao mesmo tempo que promova uma atividade anti-patogênica, atua com destruição tecidual, o que poderia justificar uma produção diminuta no tecido ocular, ou talvez pela falta na produção e MIP-2 pela EPR. Os níveis de IL-17 atuam na perturbação da barreira hemato-retiniana, o que dependendo do momento é importante para o tecido ocular, pois auxilia na passagem de células do sistema imune pelo sistema vascular, e esta é controlada pela secreção de IFN-γ e IL-4 que por sua vez são controlados pela secreção de IL-2. A IL-6 e IL-1 são responsáveis pela manutenção da IL-17, no entanto para que tenhamos uma grande demanda de IL-17 temos que ter a presença de TNF-α [45] que se mostrou presente em todos os modelos, mas aparentemente não em nível suficiente para a expressão da IL-17.

Em um último momento optamos por acrescentar ao nosso grupo de estudo animais C57BL/J6 imunizados com antígenos produzidos por irradiação. Este modelo de vacina se utiliza de taquizoitos de *T. gondii* irradiados para induzir a esterilização do parasita sem causar a morte celular, mantendo a estrutura, a fisiologia e as proteínas inalteradas, inviabilizando a sua formação cística. Zorgi *et al*. [35] descreve a capacidade de a vacina induzir a produção de IL-4, IL-10 e IFN-γ, indicando uma resposta integrada entre os perfis Th1 e Th2. E similar ao descrito por Foroutan *et al*. [36] quanto a vacina Pvax-tGmic13 (vacina gênica) capaz de aumentar o tempo de sobrevida dos indivíduos vacinados, e diminuindo consideravelmente as quantidades de cistos cerebrais [36]. Mas nosso grupo apenas demonstrou a mesma expressão de IL-6, de maneira mais efetiva que o grupo infectado; IL-10, similar ao controle, porém inferior às células isoladas do grupo infectado e TNF-α em mesma proporção que os dois grupos. Cada método de vacina pode promover diferentes tipos de resposta, como descrito por Zhang *et al*. [70], onde ao se utilizar de ROPS, moléculas altamente expressas no *T. gondii*, há a geração de resistência ao estímulo IFN-γ do hospedeiro.

Em resumo, Garweg *et al*. [45] explicita a existência de dois perfis de citocinas: (Th1 – IFN-γ, IL-2, IL-12) com resposta predominantemente celular e (Th2 – IL-4, IL-

6 e IL-10) com resposta primariamente humoral, no qual nossos achados, corroboram com um perfil diretamente primário, similar a resposta humoral. Tal como, Torres-Morales *et al*. [66] que classifica esta interação com um perfil mais tendencioso a Th2. Tendencioso, pois o perfil Th1 ou Th2 não implica no estímulo pelo peptídeo e cepa causadores, mas sim pelos efeitos clínicos resultantes, ressaltando que nos estímulos *ex-vivo* este perfil é Th2 quanto que para a toxoplasmose congênita concentra-se no perfil Th1 [66]. O perfil Th17 foi descartado devido aos baixos níveis de IL-17A. Mas como analisado por Garweg *et al*. [45], apresenta sua relação direta com a IL-2, o que também não obtivemos em nossos estudos. Por fim considerando os nossos grupos vacinados, não apresentamos similaridades com Huang Si *et al*. [69] que alega que durante a imunização de seus grupos experimentais, o perfil mais visto foi o Th1. Mas que por fim o nosso grupo vacinado ainda assim se enquadra no perfil Th2.

Considerando os achados até o momento e a dificuldade de se manter material primário em cultivo *ex vivo*, os estudos aqui apresentados contribuem com a compreensão da capacidade da célula do epitélio pigmentado da retina na sua atuação de defesa da estrutura ocular, durante a infecção pelo *T. gondii*, seja na identificação de estruturas estranhas ou a sua migração efetiva. E mesmo de maneira experimental podemos entender parte do funcionamento celular diante algumas situações que requisitem a ação defensiva do bulbo do olho.

6 CONCLUSÃO

As células do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) apresentam capacidade para identificar os fatores expressos pelo *Toxoplasma gondii*, realizando a migração celular até o sítio do parasita. Este fenômeno abrange tanto as células de linhagem ARPE-19, quanto as obtidas a partir do isolamento da estrutura ocular dos camundongos C57BL/j6. Além disso, a ARPE-19 infectada assim como a célula saudável ao ser expostas ao parasita, realiza o mesmo efeito migratório.

Por outra ótica, todos os grupos experimentais apresentaram uma resposta marcante quanto a secreção de IL-6, IL-10 e TNF-α. De forma que, apesar de as células ARPE-19 apresentarem sempre o mesmo padrão de expressão da citocina, quando na presença de células efetoras (RAW), o potencial de expressão destas citocinas é aumentado.

A imunização dos animais é capaz de apresentar resposta para as citocinas estudadas em níveis intermediários quando referente a IL-6, sugerindo uma resposta pro-inflamatória próxima a resposta de animais infectados, porém abaixo destes níveis, enquanto animais controle demoram mais para a expressão desta citocina, possivelmente considerada uma vantagem para o sistema imunológico, com provável minimização dos danos causados pela infecção; enquanto a resposta por IL-10 se mostra mais presente em animais infectados, sugerindo uma plausível resposta pró-resolutiva;

Por fim, a utilização do sobrenadante obtido da infecção da ARPE-19 pelo *T. gondii* não apresentam efeito algum sobre a célula; enquanto o uso de antígenos obtidos do *T. gondii* RH, aparenta ter envolvimento com a célula ARPE-19 em um nível dose dependente inversamente proporcional.

Contudo, baseado na literatura estudada o perfil imunológico da célula ARPE-19 é claramente T(H)-2, independente do contato ser primário ou secundário, confirmando que o EPR tenha a sua capacidade pró-resolutiva, independentemente de outras estruturas, porém quando envolvida com outros tipos celulares, esta resposta é aumentada o que seja uma provável causa das lesões retinianas, já observadas em estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

1. Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasma in pregnancy. Association of Professors of Medicine. 2005; 118:212-216.
2. Blader IJ, Saeij JP. Communication between Toxoplasma gondii and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion and virulence. APMIS. 2009; 117 (5-6): 458-476.
3. Robert-Gangneux F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. J infect. 2014; 68: 125-133.
4. Kim K, Weiss LM. Toxoplasma: the next 100 years. Microb Infect. 2008; 10:978-984.
5. Miguel ND, Echeverria PC, Angel SO. Differential subcellular localization of members of the Toxoplasma gondii small heat shock protein family. Eukaryot Cell. 2005; 4:1990-1997.
6. Silva VO, Maia MM, Torrecilhas AC, Taniwaki NN, Namiyama GM, Oliveira KC, Ribeiro KS, Toledo MS, Xander p, Pereira-Chioccola VL. Extracellular vesicles isolate from Toxoplasma gondii induce host imune response.
7. Lie S, Vieira BR, Arruda S, Simões M, Ashander LM, Furtado JM, Smith JR. Molecular basis of the retinal pigment epitelial changes that characterize the ocular lesion in toxoplasmosis. Microorganisms. 2019; 7(405):1-17.
8. Carey KL, Domajie CG, Ward G. Identification and molecular characterization of GRAB, a novel, proline-rich, dense granule protein of Toxoplasma gondii. Mol Viochem Parasitol. 2000; 105: 25-37.
9. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Exp. Eye Res. 1996; 62: 155-169.
10. Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of Toxoplasma gondii strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1411-1414.
11. Menzies FM, Henriquez FL, Roberts CG. Immunological controlo f congenital toxoplasmosis in the murine model. Immunol Lett. 2008; 115:83-89.
12. Lu F, Huang S, Kasper LH. The temperature-sensitive mutants of Toxoplasma gondii and ocular toxoplasmosis. Vaccine. 2009; 27: 573-580.

13. Chu D, Moroda M, Piao LX, Aosai F. CTL induction by DNA vaccine with Toxoplasma gondii-HSP70 gene. Parasitology International. 2014; 63: 408-416.
14. Bollani L, Stroccio L, Stronati M. Congenital toxoplasmosis. Early Hum Dev. 2013; 89:70-71.
15. Tedesco RC, Vitor RWA, Brandão GP, Calabrese ks. Ocular toxoplasmosis signis in mice embryo. Micron. 2007; 38: 729-733.
16. Wujcicka W, Gaj Z, Wikensynski J, Nowakowska D. Contribution of IL-6-174 G>C and IL1B+3954 C>T polymorphisms to congenital infection with Toxoplasma gondii. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34: 2287-2294.
17. Zhou Y, Yoshida S, Kubo Y, Yoshimura T, Kobayashi Y, Nakama A, Yamaguchi M, Ishikawa K, Oshima Y, Ishibashi T. Different distributions of M1 and M2 macrophages in mouse model of laser-induced choroidal neovascularization. Molecular Medicine Reports. 2017; 15: 3949-3956.
18. Meira CS, Pereira-Chiccola VL, Vidal JE, de Mattos CCB, Motoie G, Costa-Silva TA, Gava R, Frederico FB, de Mattos LC. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN-γ, TNF-α, and IL-10 levels. Frontiers in microbiology. 2014; 5 (492): 1-7.
19. Goldenberg D, Goldstein M, Loewnstein A, Habot-Wilner Z. Vitreal, retinal, and choroidal findings in active and scarred toxoplasmosis lesions: a prospective study by spectral-domain optical coherence tomography. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2013; 251: 2037-2045.
20. Hiramoto RM, Galisteo Jr AR, do Nascimento N, de Andrade Jr, HF. 200Gy sterilised Toxoplasma gondiii tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. Vaccine. 2002, 20: 2072-2081.
21. Tabbara KF. Disruption of the choroidoretinal interface by Toxoplasma. Eye. 1990; 4: 366-373.
22. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis: recent developments. Exp Parasitol. 2010; 124: 10-25.
23. Fu X, Wu B, Huang B, Zheng H, Huang S, Gan Y, Shen J, Lun ZR, Lu F. The correlation of Tim-3 and IFN-γ expressions in mice infected with Toxoplasma gondii during gestation. Parasitol Res. 2015; 114: 125-132.
24. Gaddi PJ, Yap GS, Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. Immunol Cell Biol. 2007; 85: 155-159.

25. Delair E, Creuzet C, Dupouy-Camet J, Roisin MP. In vitro effect on TNF-α and IFN-γ in retinal cell infection with Toxoplasma gondii. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2009; 50 (4):1754-1760.
26. Song HB, Jun JO, Kim JH, Lee YH, Choi MH, Kim JH. Disruption of outer blood-retinal barrier by Toxoplasma gondii-infected monocytes is mediated by paracrinely activated FAK-signaling. Plos One. 2017: 1-14.
27. Buzoni-Gatel D, Wets C. Toxoplasma gondii and subversion of the immune system. TRENDS in Parasitol. 2006; 22(10): 448-451.
28. Fenoy IM, Sánchez VW, Soto AS, Picchio MS, Martins V, Goldman A. Toxoplasma gondii infection modulate systemic allergic immune response in BALB/c mice. Experimental Parasitology. 2015; 154:47-50.
29. Brunet J, Pfaff AW, Abidi a, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, et al. Toxoplasma gondii exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. Cell Microbiol. 2008;10:908-920.
30. Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP. Infection with Toxoplasma gondii results in dysregulation of the host cell cycle. Cell Microbiol. 2008; 10:1153-1165.
31. Zhou DH, Yuan ZG, Zhao FR, Li HL, Zhou Y, Lin RQ, Zou FC, Song HQ, Xu MJ, Zhu XQ. Modulation of mouse macrophage proteome induced by Toxoplasma gondii tachyzoites in vivo. Parasitol Res. 2011; 109:1637-1646.
32. Saeij JPJ, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature. 2007; 445(7125): 324-327.
33. Li W, Nagineni CN, Hooks JJ, Chepelinsky AB, Egwauagu CE. Interferon-γ signaling in human retinal pigment epithelial cells mediated by STAT 1, ICSBP and IRF-1 transcription factors. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1999; 40(5): 976-982.
34. Weeratunga P, Herath TUB, Kim TH, Lee HC, Kim JH, Lee BJ, Lee ES, Chathuranga k, Chaturanga WAG, Yang CS, Ma JY, Lee JS. Dense granule protein-7 (GRA-7) of Toxoplasma gondii inhibits viral replication in vitro and in vivo. Journal of Microbiology. 2017; 55 (11): 909-917.
35. Zorgi NE, Galiesteo Jr AJ, Sato MN, do Nascimento N, Andrade Jr HF. Immunity in the spleen and blood of mice immunized with irradiated Toxoplasma gondii tachyzoites. Med Microbiol. 2016; 205: 297-314.

36. Foroutan M, Zaki L, Ghaffarifar F. Recent progress in microneme based vaccines development against Toxoplasma gondii. Clin Exp Vaccine Res. 2018; 7: 93-103.
37. Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of Toxoplasma gondii replication in human retinal pigment epithelial cells. Infection and Immunity. 1996; 64(10): 4188-4196.
38. Simsek M, Ozdal PC, Kocer AM. Optic nerve involvement in ocular toxoplasmosis: 12 year data from a tertiary referral center in Turkey; Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 2019: Ahead of Print.
39. Ashander LM, Lie S, Ma Y, Rochet E, Washington JM, Furtado JM, Appukuttan B, Smith JR. Neutrophil activities in human ocular toxoplasmosis: an in vitro study with human cells. Immunology and microbiology. 2019; 60 (14): 4652-4660.
40. Rudzinski M, Argüelles C, Couto C, Oubiña JR, Reina S. Immune mediators Against Toxoplasma gondii during reactivation of toxoplasmic retinochoroiditis. Ocular immunology and inflammation. 2018;1-9.
41. Sauer A, Villar O, Creuzot-Garcher C, Chiquet C, Berrod JP, Speeg-Schatz C, Bourcier T, Candolfi E. Intraocular levels of interleukin 17AA (IL-17A) and IL-10 as respective determinant markers of toxoplasmosis and viral uveitis. Clinical and Vaccine Immunology. 2015; 22 (1):72-78.
42. Shen Y, Xie C, Gu Y, Li X, Tong J. Illumination from light-emitting diodes (LEDs) disrupts pathological cytokines expression and activates relevant signal pathways in primary human retinal pigment epithelial cells. Experimental Eye Research. 2015; xxx: 1-12.
43. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis1. J Immunol. 2010;184(4):1776-1783.
44. Barbosa BF, Lopes-Maria JB, Gomes AO, Angeloni MB, Castro AS, Franco os, Fermino ml, Roque-Barreira MC, Ietta F, Martins-Filho AO, Silva DAO, Mineo JR, Ferro EAV. IL-10, TGF-beta1, and IFN- gamma modulate intracelular signaling pathways and cytokine production to control Toxoplasma gondii infection in BeWo trophoblast cells. Biology of Reproduction. 2015; 92(3):1-13.
45. Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(2): 211-220.

46. Straus O. The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev. 2005; 85: 845-881.
47. Tedesco RC, Smith RL, Corte-Real S, Calabrese KS. Ocular toxoplasmosis: the role of retinal pigment epithelium migration in infection. Parasitol Res. 2004; 92:467-472.
48. Frost LS, Mitchell CH, Boesze-Battaglia K. Autophagy in the eye: implications for ocular cell health. Exp Eye Res. 2014; 124: 56-66.
49. Wenkel H, Streilein JW. Analysis OF IMMUNE deviation elicited by antgens injected into the subretinal space. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998;39:1823-1834.
50. Bok D, Young R. Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium. In: Zinn KM, Marmar MF (eds). The retinal pigment epithelium. Harvard University Press, Cambridge.
51. Nasare AM, Tedesco RC, Cristovam PC, Cenedese MA, Galisteo Jr AJ, Andrade Jr HF, Gomes JAP, Guimarães EV, Barbosa HS, Alonso LG. Toxoplasma gondii infection of Chicken embryos causes retinal changes and modulates HSP90B1 gene expression: a promising ocular toxoplasmosis model. European Journal of Microbiology and Immunology. 2015; 5(4): 316-320.
52. Liversidge J, McKay D, Mullen G, Forrester JV. Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE2 and membrane-bound mechanisms. Cell Immunol. 1993;149:315-330.
53. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. Eur J Ophthalmol. 2011; 21 (6 Suppl): 3-9.
54. Williams LL, Lew HM, Shannon BT, Singley CT, Davidorf FH, Jin R, Wolinsky JS. Phagocytosis of latex beads in defective in cultured huan retinal pigment epithelial cells with persistent rubella virus infection. American Journal of Pathology. 1993; 142 (2): 451-461.
55. Mo J, Zhang M, Marshall B, Smith S, Covar J, Atherton S. Interplay of autophagy and apoptosis during murine cytomegalovirus infection of RPE cells. Molecular Vision. 2014; 20:1161-1173.
56. Sun PR, Gao FF, Choi HG, Zhou W, Yuk JM, Kwon J, Lee YH, Cha GH. Dipenyleneiodonium induces growth inhibition of Toxoplasma gondii through ROS induction in ARPE-19 cell. Korean J Parasitol. 2019; 57(2): 83-92.

57. Zhou W, Quan JH, Gao FF, Ismail HAHA, Lee YH, Cha GH. Modulated gene expression of toxoplasma gondii infected retinal pigment epithelial cell line (ARPE-19) via PI3K/Akt or mTOR signal pathway. Korean J Parasitol. 2018; 56 (2): 135-145.
58. Rochet E, Brunet J, Sabou M, Marcellin L, Bourcier T, Candolfi E, Pfaff AW. Interleukin-6-driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. Infection and Immunity. 2015; 83 (5): 2109-2117.
59. Heit B, Kubes P. Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. Science Signaling. 2003; 1-13.
60. Shang P, Stepicheva NAM Hose S, Zigler Jr JS, Sinha D. Primary cell cultures from the mouse retinal pigment epithelium. JOVE. 2018; 133:1-7.
61. Elner VM, Scales W, Elner SG, Danforth J, Kunkel SL, Strieter RM. Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. Exp. Eye Res. 1992; 54:361-368.
62. Choi SH, Park SJ, Cha GH, Quan JH, Chang NS, Ahn MH, Shin DW, Lee YH. Toxoplasma gondii protects agains H_2O_2- induced apoptosis in ARPE-19 cells through the transcriptional regulation of apoptotic elements and downregulation of the p38 MAPK pathway. Acta Ophthalmologica. 2011; 89: e350-356.
63. Calabrese KS, Tedesco RC, do Valle TZ, Barbosa HS. Serum and aqueous humor cytokine response and histopathological alterations during ocular Toxoplasma gondii infection in C57BL/6 MICE. Micron. 2008; 39: 1335-1341.
64. Hooks JJ, Chan CC, Derrick B. Identification of the lymphokines, Interferon-gamma and interleukin-2, in inflammatory eye diseases. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1988; 29(9): 1444-1451.
65. Thiemi C, Schlickeiser S, Metzner S, Dames C, Pleyer U. Immune mediator profile in aqueous humor differs in patients with primary acquired ocular toxoplasmosis and recurrent acute ocular toxoplasmosis. Mediators of Inflammation. 2019; 1-12
66. Torres-Morales E, Taborda L, Cardona N, De-la-Torre A, Sepulveda-Arias JC, Patarroyo MA, Gomez-Marin JE. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. Med Microbiol Immunol. 2014; 203:315-322.

67. Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, et al. TNF-alpha disrupts morphologic and functional barrier properties of palarized retinal pigment epithelium. Exp Eye Res. 2013;110:59-69.
68. Yamawaki T, Ito E, Mukai A, Ueno M, Yamada J, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro K. The ingenuous interactions between macrophages and functionally plastic retinal pigment epithelium cells. Arvo Journals. 2019; 57:5945-5953.
69. Huang SY, Chen K, Wang JL, Yang B, Zhu XQ. Evaluation of protective immunity induced by recombinant calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) protein against acute toxoplasmosis in mice. Mocrobial pathogenesis. In press 2019.
70. Zhang Z, Li Ym Wang M, Xie Q, Li P, Zuo S, Kong L, Wang C, Wang S. Immune protection of Rhoptry protein 21 (ROP21) of Toxoplasma gondii as a DNA vaccine against toxoplasmosis. Frontiers in Microbiology. 2018; 9(909): 1-10.

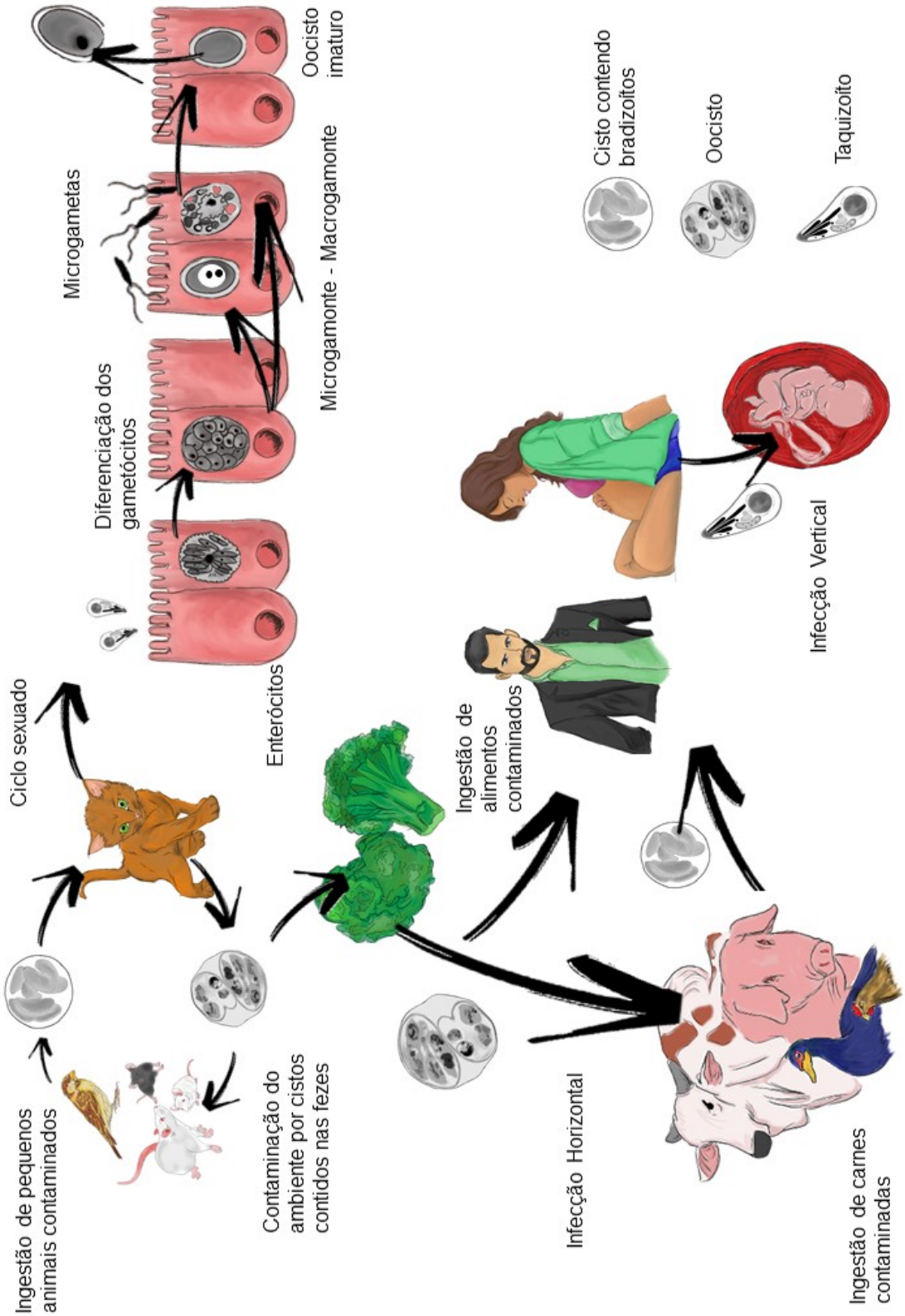
Bibliografia consultada

Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academies Press. 2011.

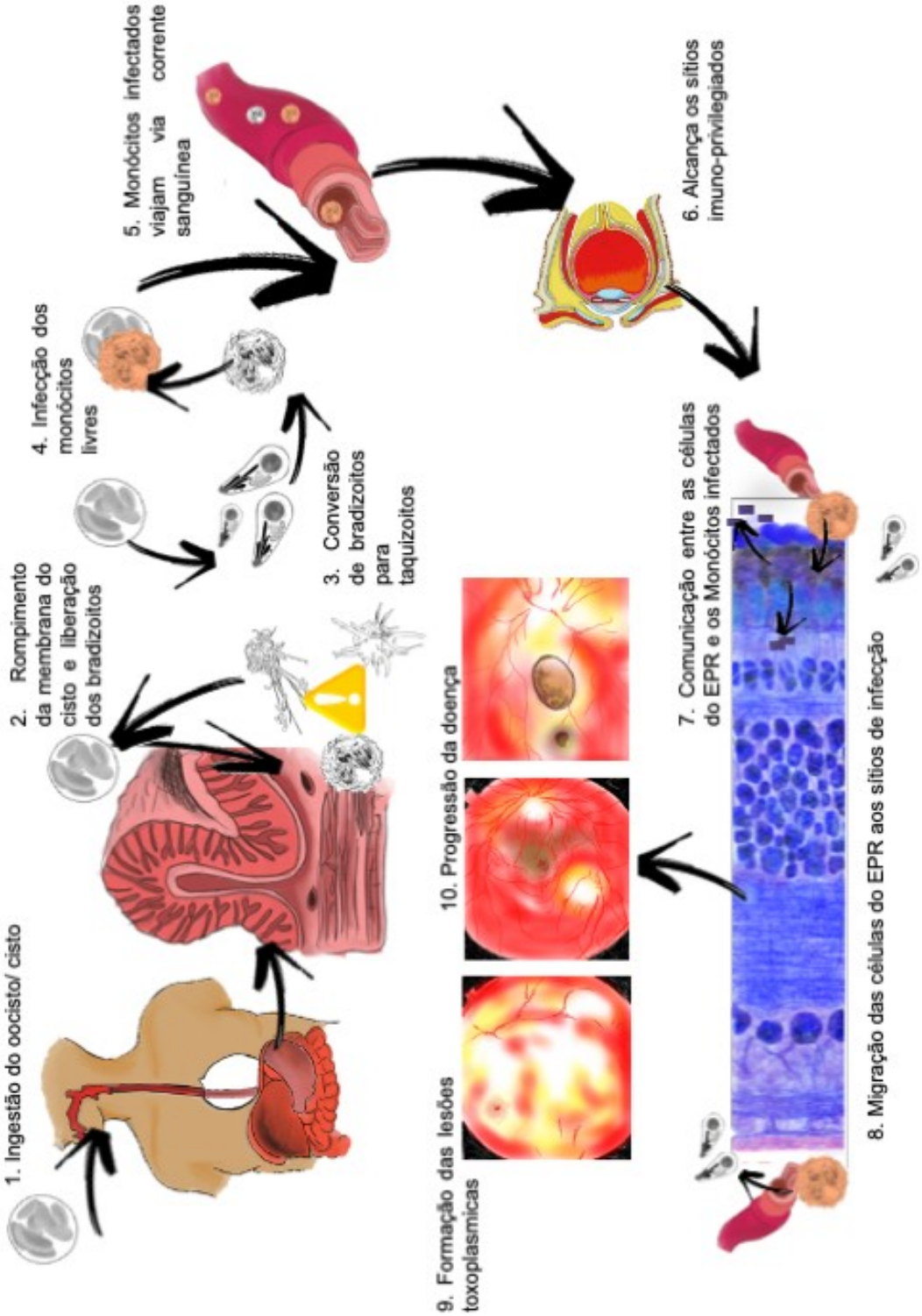
Conboy JE. Algumas medidas típicas univariadas da magnitude do efeito (*). Análise Psicológica. 2003; 2 (21): 145-158.

Hedges LV. Distribution of Thery for Glass's estimator of Effect Size and related Estimators. Journal of Educational Statistics. 1981; 6 (2): 107-128.

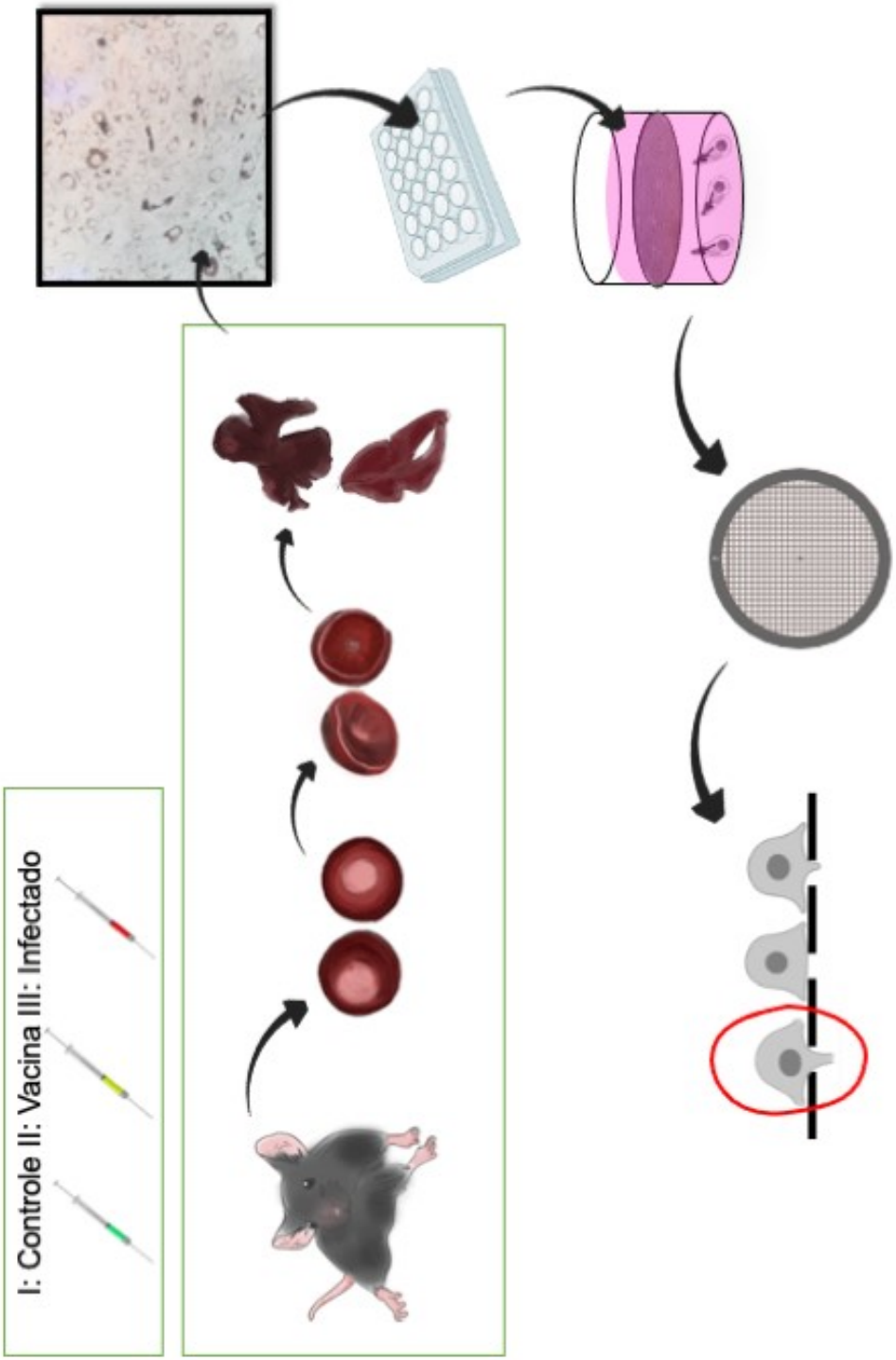
APÊNDICE A


Ingestão de pequenos animais contaminados
Ciclo sexuado
Contaminação do ambiente por cistos contidos nas fezes
Enteróctitos
Diferenciação dos gametócitos
Microgametas
Microgamonte - Macrogamonte
Oocisto imaturo
Ingestão de alimentos contaminados
Infecção Horizontal
Ingestão de carnes contaminadas
Infecção Vertical
Cisto contendo bradizoítos
Oocisto
Taquizoíto

APENDICE B


1. Ingestão do oocisto/ cisto
2. Rompimento da membrana do cisto e liberação dos bradizoitos
3. Conversão de bradizoitos para taquizoitos
4. Infecção dos monócitos livres
5. Monócitos infectados viajam via corrente sanguínea
6. Alcança os sítios imuno-privilegiados
7. Comunicação entre as células do EPR e os Monócitos infectados
8. Migração das células do EPR aos sítios de infecção
9. Formação das lesões toxoplasmicas
10. Progressão da doença

APENDICE C



ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – (CEUA/IMT)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 08 de Dezembro de 2016

Ilmo(a)
Dr(a). Andres Jimenez Galisteo Jr.
(aos cuidados de Aléx Martins Nasaré)

Certificamos que a proposta intitulada **"Participação do epitélio pigmentado da retina durante a infecção por Toxoplasma gondii in vitro"**, registrada com o nº **000349A**, sob a responsabilidade de **Andres Jimenez Galisteo Jr.** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 02/01/2017 a 29/01/2021							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	**Linhagem**	**Idade**	**Peso**	**Material**	**Quantidade**		
					M	**F**	**M+F**
Camundongo isogênico	C57Bl/6j	recém desmamados	20-22g	*a ser Colefado*	30	0	30
Origem: Biotério - FMUSP					**TOTAL**		30

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP