

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

As cepas RH e ME-49 de *Toxoplasma gondii* induzem a formação de corpos lipídicos em  
linhagens de macrófagos murinos e fibroblastos

Mário Cézar de Oliveira

Uberlândia  
Janeiro – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

As cepas RH e ME-49 de *Toxoplasma gondii* induzem a formação de corpos lipídicos em linhagens de macrófagos murinos e fibroblastos

Dissertação apresentada ao  
Colegiado do Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre.

Mário César de Oliveira  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Neide Maria da Silva

Uberlândia  
Janeiro – 2014

## *Dedicatória*

*Aos meus pais, Lia e Lico, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente. Muito obrigado pelo amor incondicional e por todos os esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui. Sem vocês nada disso existira e não teria sentido.*

*Vocês são meus verdadeiros exemplos. Obrigado!*

*À minha irmã, Marina Cézar, por todo o convívio desde criança, pelos momentos de alegria e descontração que vivemos juntos e que temos quando nos encontramos. Obrigado!*

*À Loyane, que entrou em minha vida no momento certo e que só me trouxe alegrias e satisfações. Obrigado por tudo, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e pelos momentos incríveis que serão eternos. Pela dedicação, não só na vida pessoal, mais também na vida acadêmica, Te amo!*

*À Amaury e Regina, duas pessoas incríveis que tive o prazer de conhecer e conviver. Obrigado pela atenção, carinho e pelos momentos juntos. Vocês se tornaram meus segundos pais. Obrigado!*

*"Aprenda como se você fosse viver para sempre,*

*Viva como se você fosse morrer amanhã"*

*Mahatma Gandhi*

## *Agradecimentos especiais*

*À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Neide Maria da Silva, por ter me aceitado para fazer meu estágio curricular e me orientado durante o mestrado. Pela ajuda durante todo esse período.*

*Obrigado pela oportunidade e pelos ensinamentos.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Jane Lima dos Santos, pelo carinho e atenção. Por te me ensinado a gostar de imunologia entre as aulas de Imunologia básica e médica na UESC, por ter me enviado para Uberlândia para realizar meu estágio curricular.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Bellisa Freitas, uma das primeiras pessoas que tive contato ao chegar à UFU, obrigado pela paciência em me ensinar a trabalhar com cultura celular entre outros ensinamentos, pela atenção e carinho.*

## *Agradecimentos*

*Ao grupo do Laboratório de Imunopatologia: pelos momentos de trabalho e descontração. Romulo, Layane, Natália, Priscila e Marisol. De modo especial, obrigado a Dr<sup>a</sup> Wânia Rezende e Paulo Victor pela ajuda nas reações e no desenvolvimento do trabalho.*

*Aos colegas do Laboratório de Histologia e Embriologia: a secretária Juscélia e aos técnicos Fabrício, Ester e Mariani, obrigado pelo convívio, pelos momentos de descontrações e ajuda no desenvolvimento do trabalho.*

*As colegas do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução: Dr<sup>a</sup> Eloisa, Pâmela, Angélica, Andressa, Rafaela e Mariana. Obrigado pela atenção e ajuda.*

*As secretárias da Pós-Graduação, Lucileide e Lucélia, pela ajuda e atenção em resolver todos os problemas encontrados.*

*Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPQ.*

## **Lista de abreviações**

AA – Ácido araquidônico  
ADRP – Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos  
AMA1 - Antígeno de membrana apical 1  
CCR2 – Receptor de quimiocina 2  
CD - Grupo de diferenciação  
CD40L - Ligante da molécula CD40  
COX - Cicloxigenase  
DAG - Diacilglicerol  
DCs – Células dendríticas  
ER – Retículo endoplasmático  
GRAs - Glicoproteínas dos grânulos densos  
IFN-  $\gamma$  – Interferon-gama  
Ig– Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
JAK – Quinase Janus  
LDs – Corpos lipídicos  
MAPK – Proteína quinase associada com mitógeno  
MG – Minas Gerais  
MHC – Complexo de histocompatibilidade maior  
MIC – Proteínas de micronemas  
MyD88 – Fator de diferenciação mieloide 88  
NF $\kappa$ B – Fator nuclear  $\kappa$ B  
NK – Células “Natural Killer”  
NO – Óxido nítrico  
PAT – Perilipin-ADRP-TIP47  
PEF - Fator de incremento de penetração  
RONs - Proteínas constituintes das roptrias  
ROPs – Proteínas das roptrias  
SOCs - Via de sinalização das citocinas  
STAT1- Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1  
TAG - Triacilglicerol  
TLRs – Receptores tipo - Toll

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

5- LOX- 5-lipoxigenase



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática comparando a ultraestrutura de dois estágios infectantes de <i>T. gondii</i> , taquizoíto (esquerda) e bradizoíto (direita).....	14
<b>Figura 2.</b> A formação de corpos lipídicos.....	24
<b>Figura 3.</b> Infecção por <i>T. gondii</i> induz a formação de corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.....	33
<b>Figura 4.</b> Corpos lipídicos são inibidos através do tratamento com ácido acetilsalicílico.....	35
<b>Figura 5.</b> Fibroblastos são mais suscetíveis a infecção por <i>T. gondii</i> .....	37
<b>Figura 6.</b> A inibição dos corpos lipídicos aumenta a virulência por <i>T. gondii</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> A infecção por <i>T. gondii</i> induz a expressão da proteína ADRP em macrófagos RAW 264.7.....	41
<b>Figura 8.</b> A infecção por <i>T. gondii</i> induz a expressão da proteína ADRP em macrófagos J774.1.....	42
<b>Figura 9.</b> A infecção por <i>T. gondii</i> induz a expressão da proteína ADRP em fibroblastos NIH/3T3.....	43

## Sumário

Resumo.....	XI
Abstract.....	XII
1. Introdução.....	13
1.1 O organismo.....	13
1.2 Epidemiologia.....	13
1.3 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	14
1.4 Interação parasito-hospedeiro.....	17
1.5 Formas infectantes e ciclo biológico.....	19
1.6 Cepas de <i>T. gondii</i> .....	21
1.7 Resposta Imune ao parasito.....	22
1.8 Corpos lipídicos.....	24
1.9 Biogênese e metabolismo dos LDs.....	26
1.10 Interação entre LDs–patógenos.....	27
2. Justificativa.....	29
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivo específico.....	30
4. Materiais e métodos.....	31
4.1 Cultura celular.....	31
4.2 Parasitos.....	31
4.3 Avaliação dos LDs por microscopia de luz.....	31
4.4 Inibição da formação dos LDs.....	32
4.5 Coloração de hematoxilina e eosina.....	33
4.6 Imunohistoquímica para detecção da proteína ADRP.....	33
4.7 Análise estatística.....	34
5. Resultados.....	35
5.1 Infecção por <i>T. gondii</i> induz a formação de corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.....	35
5.2 A formação dos corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas é inibida pelo ácido acetilsalicílico.....	37
5.3 Fibroblastos são mais suscetíveis à infecção por <i>T. gondii</i> .....	39
5.4 A inibição da formação dos corpos lipídicos aumenta a virulência por <i>T. gondii</i> .....	41
5.5 Infecção por <i>T. gondii</i> induz a expressão da proteína ADRP em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.....	43
6. Discussão.....	47
7. Conclusões.....	52
8. Referências bibliográficas.....	54

## Resumo

Os corpos lipídicos são organelas ativas associadas a funções biológicas, além de serem importantes sítios onde os mediadores lipídicos são encontrados. Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos (ADRP) é uma proteína conhecida por estar associada aos corpos lipídicos e foi originalmente encontrada nos estágios iniciais da diferenciação de adipócitos e é expressa em uma variedade de tecidos e células. O presente trabalho teve como objetivo investigar a relação entre a formação dos corpos lipídicos e a infecção pelas cepas tipo I e tipo II de *Toxoplasma gondii* em células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) e não hematopoiéticas (NIH/3T3). Para isto, macrófagos RAW 264.7 e J774.1 e fibroblastos NIH/3T3 foram infectados com cepas de *T. gondii* e a formação dos corpos lipídicos foi analisada pela coloração *Oil Red*, bem como a expressão de ADRP por imunofluorescência. Foi observado que ambos os macrófagos e fibroblastos apresentam formação de corpos lipídicos constitutivamente e o estímulo com IFN- $\gamma$  aumenta a formação dos corpos lipídicos em todas as linhagens celulares, entretanto, maiores níveis de corpos lipídicos foram observados nas células J774.1. A infecção por *T. gondii* aumentou a formação dos corpos lipídicos em todas as linhagens celulares comparada com as células não infectadas e a cepa ME-49 foi capaz de induzir maior formação de corpos lipídicos nas células J774.1 e NIH3T3 comparada com a cepa RH. Além disso, fibroblastos NIH/3T3 apresentaram maior parasitismo comparados com as outras linhagens celulares estudadas. A inibição da formação dos corpos lipídicos pela aspirina (AAS) aumentou o parasitismo em macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) comparados com fibroblastos (NIH/3T3). Além disso, células infectadas com a cepa ME-49 apresentaram altos níveis da expressão de ADRP comparados com as células infectadas com a cepa RH de *T. gondii*. Os resultados do presente trabalho sugerem que a formação dos corpos lipídicos contribui para a multiplicação dos parasitos em fibroblastos, fornecendo lipídios para membrana desses organismos, entretanto, em macrófagos parece que os corpos lipídicos funcionam como organelas da imunidade inata que contribuem para o controle da multiplicação do parasito.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Células hematopoiéticas e não hematopoiéticas; Corpos lipídicos.

## Abstract

Lipid droplets (LDs) are active organelles linked to biological functions, in addition to being important sites for lipid mediators storage. Adipocyte differentiation-related protein (ADRP) is known to be a lipid droplet-associating protein, and was originally found in the early stages of adipocyte differentiation and is expressed in a variety of tissues and cells. This work aimed to investigate the relationship of LDs formation and *Toxoplasma gondii*, type I and type II infection of hematopoietic (RAW 264.7 and J774.1) and non-hematopoietic (NIH/3T3) cells. For this purpose, RAW 264.7 and J774.1 macrophages and NIH/3T3 fibroblasts were infected with strains of *T. gondii* and LDs formation was analyzed by oil red staining and ADRP expression by immunocytochemistry. It was observed that both macrophages and fibroblast presented LDs formation constitutively, and IFN- $\gamma$  stimulus increased LDs formation in all cell lines, however, higher LD levels were found in stimulated J774.1 macrophages. Infection with *T. gondii* increased the LDs formation in both cell lines compared with uninfected cells and ME-49 strain was able to induce higher LDs formation in J774.1 and NIH/3T3 cells compared with RH strain. In parallel, NIH/3T3 presented higher parasitism compared with the other cell lines studied. Lipid droplets inhibition by aspirin (ASA) increased parasitism in macrophages (RAW 264.7 and J774.1) compared with fibroblasts (NIH/3T3). Additionally, cells infected with ME-49 strain presented higher levels of ADRP expression compared with cells infected with RH strain of *T. gondii*. The results obtained here suggest that the LDs formation contribute to lipid membrane of *T. gondii* and therefore parasite multiplication in fibroblasts, however, in macrophages the LDs seems to be involved in the control of *T. gondii* proliferation.

**Keyword:** *Toxoplasma gondii*; hematopoietic and non-hematopoietic cells; lipid droplets.

## 1. Introdução

### 1.1 O organismo

O filo Apicomplexa inclui um grande número de parasitos intracelulares obrigatórios do qual fazem parte *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp. (MCDONALD; SHIRLEY, 2009; KARANIS; ALDEYARBI, 2011; THAM; HEALER; COWMAN, 2012). *T. gondii* é capaz de infectar e replicar em células nucleadas do hospedeiro, que incluem todos os animais de sangue quente e alguns invertebrados, tornando-se um patógeno de importância médica e veterinária, apresentando distribuição mundial (REY, 2001; DUBEY, 2004).

*T. gondii* teve seu primeiro registro feito por Charles Nicolle e Louis Manceaux (1908) em células mononucleares do baço e do fígado de roedores africanos (*Ctenodactylus gundi*) e simultaneamente por Alfonso Splendore (1908) no Brasil identificando o parasito em tecido de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Nicolle e Manceaux nomearam o gênero *Toxoplasma* por apresentar uma forma de arco (do grego: toxo, arco; plasma, vida) (KIM; WEISS, 2008). Embora *T. gondii* apresente uma distribuição mundial, existe apenas uma espécie *Toxoplasma gondii* descrita no gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2008).

Desde seu reconhecimento como agente causador da toxoplasmose (1930), muitas manifestações clínicas têm sido atribuídas à infecção por *T. gondii* incluindo linfadenopatia, ileíte, coriorretinite, encefalite e infecções oculares tanto em crianças como em adultos. Geralmente assintomática e subclínica, a toxoplasmose pode ser grave para muitos hospedeiros, incluindo os humanos. *T. gondii* pode ser letal para o desenvolvimento fetal (causando aborto espontâneo ou doenças congênitas) e para indivíduos imunocomprometidos (particularmente em pacientes com câncer, portadores do vírus HIV e transplantados) (JACKSON; HUTCHISON, 1989; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; WEISS; DUBEY, 2009).

### 1.2 Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente 25-30% da população humana mundial esteja infectada por *T. gondii* (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Contudo, as prevalências variam muito entre países e, muitas vezes dentro de um determinado país ou entre diferentes comunidades de uma mesma região (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). Baixa soroprevalência (10-30%) foi encontrada na América do Norte, sudoeste da Ásia, norte da Europa e nos países situados no \*Sahel da África. Prevalências moderadas (30-50%) foram

---

\*Sahel – região da África situada entre o deserto do Saara e as terras mais férteis ao sul

encontradas em países localizados no centro e no sul da Europa e altas prevalências foram encontradas na América Latina e nos países Africanos tropicais (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No Brasil, 50-80% da população adulta é soropositiva para infecção por *T. gondii* e a transmissão pela água tem sido implicada como uma das maiores causas de infecção nos humanos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DE MOURA et al., 2006).

Um estudo realizado em Uberlândia – MG demonstrou que existem diferenças entre pacientes atendidos em hospital particular e público avaliando a idade materna, cidade de origem, idade gestacional, número de visitas ao médico durante a gestação, tipo de parto e peso do bebê ao nascer. A soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas pacientes atendidas em hospital público foi 57,6%, enquanto que naquelas atendidas em hospital particular foi de 41,9%. A frequência de toxoplasmose congênita obtida a partir da detecção de anticorpos IgM e/ou IgA específicos anti-*T. gondii* em amostras de cordão umbilical foi somente observada nas amostras obtidas a partir de pacientes atendidas em hospital público (0,8%) enquanto nenhuma amostra positiva foi detectada a partir de pacientes atendidas em hospital particular (0%). A principal alteração clínica foi coriorretinite (processo inflamatório da retina) e alta soroprevalência encontrada nos pacientes mostra que programas de triagem necessitam ser implantados para toxoplasmose (SEGUNDO et al., 2004a; 2004b).

Muitos fatores podem afetar a soroprevalência em humanos e animais. Fatores climáticos afetam a sobrevivência de oocistos no ambiente, por isso, taxas de infecção em animais produtores de carne têm um papel importante. Alta prevalência é observada em países tropicais onde o clima é úmido e quente, e por sua vez, prevalências baixas são encontradas em países áridos ou frios. Fatores antropológicos explicam uma grande parte da variação na soroprevalência humana, incluindo hábitos alimentares (meios de cozinhar carne, lavar as mãos e vegetais e tipo de carne consumido), hábitos econômicos, sociais e culturais, qualidade da água e saneamento básico (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

### **1.3 *Toxoplasma gondii***

Morfologicamente *T. gondii* possui uma estrutura alongada com forma curvilínea ou crescente com as extremidades arqueadas, podendo também apresentar um formato oval, indicando o início do processo de divisão celular (REY, 2001). Em seu interior encontramos núcleo, situado na região central do parasito ou mais próximo da extremidade posterior, organelas característica de células eucariontes (mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo

endoplasmático e lisossomo), além de outras organelas particulares ao parasito (conóide, micronemas, roptrias, grânulos densos e apicoplasto) (figura 1). O parasito apresenta dois sistemas de membrana, uma simples externa e uma dupla interna formada pelo acoplamento de duas membranas unitárias. A membrana externa é contínua, enquanto a interna é fenestrada e incompleta, principalmente no polo anterior do parasito (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; NEVES, 2005).

A região anterior do parasito é caracterizada pela presença do complexo apical onde se encontra o conóide. O complexo apical constitui uma prega localizada na membrana plasmática do parasito, delimitando uma depressão central. O conóide é uma estrutura em forma de cone, formada por três anéis de microtúbulos, sendo dois na região apical e um situado posteriormente, conhecido como anel polar. Do anel polar parte uma rede de citoesqueleto composta por vinte e dois microtúbulos que se dispõe de maneira espiral sob o complexo de membrana interna e se estendem em sentido a região posterior do parasito. No interior do conóide estão as micronemas e roptrias. Além de manter a forma do parasito, estas estruturas estão envolvidas com a mobilidade e direcionamento de vesículas secretórias durante o mecanismo de invasão (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HU et al., 2006).

Na parede interna do conóide existem dois microtúbulos justapostos entre si que acompanham toda a extensão dessa organela. Dentro dessa estrutura estão as micronemas e as roptrias (LERICHE; DUBREMETZ, 1990; NEVES, 2005). A proteólise induzida por essas organelas está associada com a invasão de *T. gondii* à célula hospedeira (CARRUTHERS, 2006).

As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas, domínios tipo integrinas, fator de crescimento epitelial e lectina, sendo localizada na região apical do parasito e abaixo do complexo da membrana interna (FOURMAUX et al., 1996; MEISSNER et al., 2002; SAOUROS et al., 2005) (figura 1). Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfícies da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; NEVES, 2005). Onze proteínas de micronemas já foram descritas (MIC1 a MIC11), sendo que a MIC-1, MIC-4 e MIC-6 possuem propriedades de adesão celular. Já a proteína MIC-2 está presente em todos os estágios invasivos do parasito e possui um importante papel no conhecimento da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

As roptrias são organelas especializadas associadas com as micronemas, sendo seu conteúdo liberado durante a invasão do parasito, movimento de junção e formação do vacúolo parasitóforo (BRADLEY et al., 2005; BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Roptrias estão

localizadas na região anterior do núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas (LYCKE; CARLBERG; NORRBY, 1975; BLACK; BOOTHROYD, 2000) (figura 1). Já foram descritas vinte e nove proteínas de roptrias (ROP1 a ROP29) e elas estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Essa internalização é feita através da liberação de enzimas proteolíticas, como ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração), que atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (KIM; WEISS, 2004). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo protéico no citoplasma da célula hospedeira e atuam na formação do vacúolo parasitóforo ficando associadas a ele, garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo e atuando no recrutamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático (SINAI; WEBSTER; JOINER, 1997; CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008).

A primeira proteína liberada pelas roptrias identificada foi a ROP-2, uma proteína transmembrânica do vacúolo parasitóforo que fica exposta no citoplasma da célula hospedeira. A ROP-2 esta envolvida na associação das mitocôndrias da célula hospedeira ao vacúolo parasitóforo (HAJJ et al., 2006). ROP-16 é uma quinase treonina/serina que penetra no núcleo das células do hospedeiro e induz a secreção de interleucina-12 (IL-12), contudo essa interação é dependente da cepa de *T. gondii* envolvida (SAEIJ et al., 2007). ROP-18 está associada com o vacúolo parasitóforo e no controle de replicação do parasito. Além disso, ROP-18 mostra alta divergência entre cepas, sendo determinante nas cepas de alta virulência (tipo I) (TAYLOR et al., 2006; BRADLEY; SIBLEY, 2007; EL HAJJ et al., 2007; LIM et al., 2013). Outras proteínas tais como Rab11 e toxofilina têm sido identificadas como proteínas pertencentes às roptrias. Rab11 está envolvida no controle de reciclagem do colesterol, enquanto toxofilina se liga a actina facilitando a invasão do parasito (HÖLTTÄ-VUORI et al., 2002; POUPEL et al., 2002).

O apicoplasto é uma organela tipo cloroplasto não fotossintetizante encontrada próximo ao núcleo do parasito formado por quatro membranas (figura 1). Sua função inclui a síntese da heme, biossíntese de lipídios e participação na via do isoprenóide. Essa via é importante na síntese da molécula sinalizadora do ácido abscísico que regula a sinalização dependente de cálcio na invasão do hospedeiro (NAGAMUNE et al., 2008).

Além das roptrias, micronemas e apicoplasto, há no citoplasma destes parasitos, estruturas envoltas por membranas de conteúdo elétron-denso. Tais estruturas denominam-se grânulos densos e contém uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (GRA1 a GRA10). Uma das funções desses grânulos é a liberação de glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, possibilitando ao parasito evadir das respostas imunes da célula



hospedeira, bem como a formação de túbulos especializados para aumentar a aquisição de nutrientes pelo parasito (COPPENS et. al., 2006; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

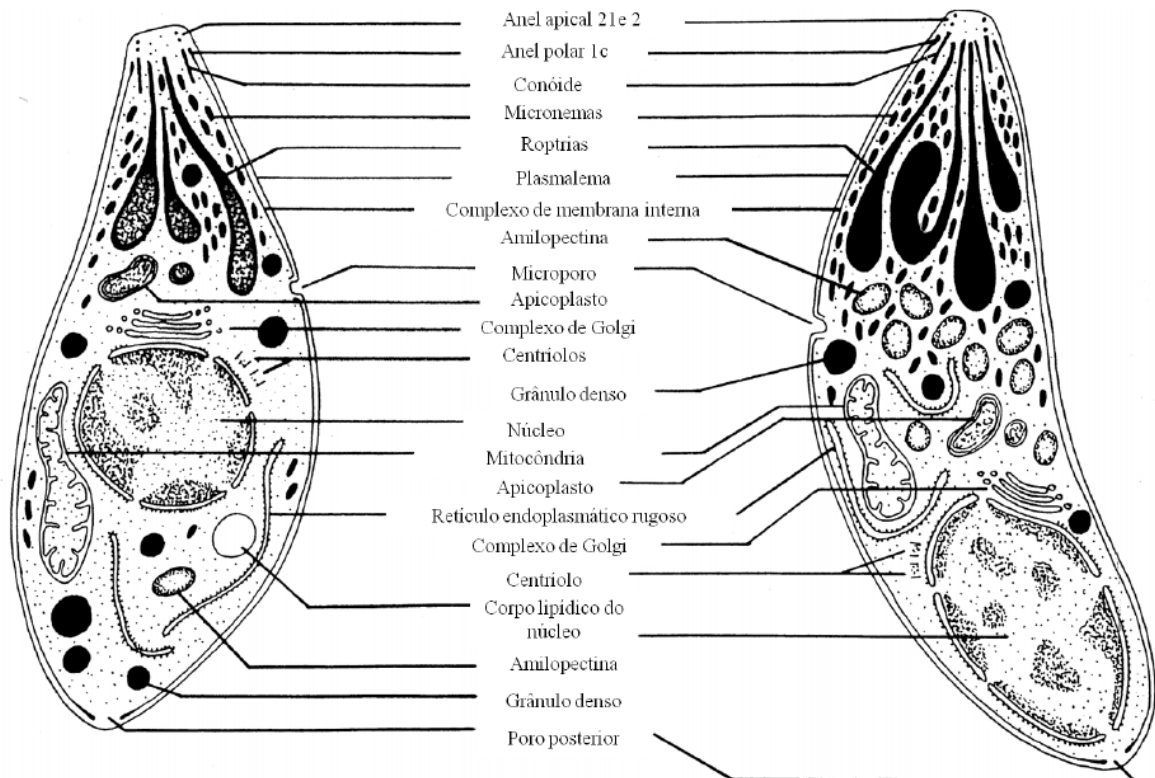


Figura 1. Representação esquemática comparando a ultraestrutura de dois estágios infectantes de *T. gondii*, taquizoíto (esquerda) e bradizoíto (direita) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

#### 1.4 Interação parasito – hospedeiro

*T. gondii* apresenta a capacidade de invadir uma variedade de células do hospedeiro. Essa invasão é um processo ativo, complexo e depende de múltiplos fatores de regulação, tais como, mobilidade do parasito e secreção de proteínas a partir de suas organelas (micronemas, roptrias e grânulos densos) (BLADER; SAEIJ, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A ligação na membrana celular do hospedeiro é um pré-requisito para invasão do parasito e requer a secreção de adesinas dependente de cálcio a partir das micronemas, tais como MIC2, que reconhecem receptores celulares do hospedeiro e promovem a orientação do parasito. A invasão celular depende de uma interação complexa entre a superfície da célula hospedeira e do parasito, um processo denominado movimentação do tipo *gliding*, onde ocorre uma interação entre actina-miosina e rearranjos dinâmicos do citoesqueleto do parasito (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Essa invasão é um processo rápido, ocorrendo

entre 15 a 30 segundos, sendo distinto do processo normal de endocitose (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

*T. gondii* forma uma associação forte entre sua extremidade apical e a membrana da célula hospedeira, denominada de movimento de junção, levando a internalização do parasito dentro do vacúolo parasitóforo. Esse movimento de junção induz o parasito a expressar em sua superfície o antígeno de membrana apical (AMA1), secretado pelas micronemas, e a secreção de proteínas constituintes das roptrias (RONs), tais como RON2, RON4, RON5 E RON8. Juntas, essas proteínas promovem a locomoção do parasito para o interior da célula hospedeira (ALEXANDER et al., 2005; DUBREMETZ, 2007; STRAUB et al., 2009). A formação da membrana do vacúolo parasitóforo requer a secreção de proteínas das roptrias, tais como ROP-2 e ROP-18, bem como a secreção de proteínas dos grânulos densos durante a primeira hora após a invasão do parasito (EL HAJJ et al., 2007; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008).

A maioria das proteínas transmembranas do hospedeiro são removidas da membrana do vacúolo parasitóforo durante o processo de invasão, alterando assim as características bioquímicas da membrana do vacúolo parasitóforo e impedindo a fusão com lisossomos ou qualquer vesícula citoplasmática. A secreção de grânulos densos também mantém o desenvolvimento de uma rede complexa de túbulos de membrana que se desenvolve a partir da membrana do vacúolo parasitóforo e se estende até o lúmen vacuolar (MERCIER et al., 2005).

Essa rede de túbulos está envolvida na troca de nutrientes entre o parasito e a célula hospedeira, facilitando o tráfego de triptofano, arginina, poliamidas, purinas, colesterol, ferro entre outros nutrientes essenciais do citoplasma celular para o parasito, auxiliando em sua sobrevivência (CHAUDHARY et. al., 2004; FOX; GIGLEY; BZIK, 2004; GAIL; GROSS; BOHNE, 2004; SEABRA et al., 2004; NISHIKAWA et. al., 2005; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Além disso, o vacúolo parasitóforo está associado com as mitocôndrias da célula hospedeira contribuindo para o metabolismo do parasito (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A saída do parasito da célula é um processo ativo que depende do aumento nas concentrações de cálcio intracelular liberado a partir do armazenamento celular (SIBLEY, 2010).

### 1.5 Formas infectantes e ciclo biológico

*T. gondii* apresenta uma forma de vida heteroxênica, tendo como hospedeiro definitivo (reprodução sexuada) gatos e outros felídeos e hospedeiros intermediários (reprodução assexuada) animais de sangue quente, incluindo humano e aves. O parasito tem três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Todas as três formas são infecciosas tanto para o hospedeiro definitivo quanto para o hospedeiro intermediário, e sua via de transmissão ocorre principalmente por ingestão oral de oocistos infecciosos do meio ambiente (solo, água ou alimentos), ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida ou vísceras de hospedeiro intermediário e transmissão transplacentária de taquizoítos, além disso, taquizoítos podem ser transmitidos através do leite da mãe infectada para o filho (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; CARRUTHERS; SUZUKI, 2007).

O taquizoíto é a forma de disseminação do parasito (grego: *tachis* = rápido), medindo 2-4  $\mu\text{m}$  de largura e 4-8 $\mu\text{m}$  de comprimento, capaz de invadir todo tipo de célula por penetração ativa, multiplicando dentro do vacúolo parasitóforo. Depois de repetidas replicações, as células do hospedeiro são rompidas e os taquizoítos são disseminados pela corrente sanguínea infectando todo o organismo, incluindo o sistema nervoso central, olhos, tecido muscular cardíaco e esquelético e placenta. Taquizoítos causam uma resposta inflamatória forte, levando a destruição tecidual característica das manifestações clínicas da doença. Sua transformação em bradizoítos é realizada pela pressão da resposta imune do hospedeiro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos são originados a partir da conversão dos taquizoítos em estágios de divisão lenta (grego: *brady* = lento), são encontrados dentro de cistos teciduais durante a infecção crônica. São morfologicamente idênticos aos taquizoítos, contudo expressam moléculas de estágio específico, apresentando função diferente. Cistos teciduais contêm centenas a milhares de bradizoítos e são formados dentro das células hospedeiras encontradas no tecido muscular cardíaco ou esquelético e cérebro. Seu tamanho é variado podendo medir entre 5 -70  $\mu\text{m}$ . Os bradizoítos podem ser liberados dos cistos e se diferenciarem em taquizoítos causando o reaparecimento da infecção em pacientes imunocomprometidos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Os oocistos são esféricos, medem entre 10-12 $\mu\text{m}$  e possuem uma parede dupla robusta que lhe confere proteção contra ações mecânicas e químicas. Sua parede é formada por mais de 90% de proteínas, sendo várias proteínas ricas em tirosina e cisteína. O oocisto é a forma

de resistência do parasito e são encontrados nas fezes de felinos. Durante a infecção aguda, milhares de oocistos são liberados nas fezes dos gatos por 7-21 dias, esses oocistos contém esporozoítos que dão origem aos taquizoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MAI et al., 2009; DUMÈTRE et al., 2013).

A reprodução sexual ocorre somente em felídeos (gatos domésticos ou selvagens). Após a ingestão de cistos presente no tecido de um hospedeiro intermediário, a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas. Os bradizoítos infectam os enterócitos, onde começam a multiplicação assexuada (endodiogenia), caracterizada pelo desenvolvimento de merozoítos dentro do esquizonte (DUBEY, 1998). Esse primeiro passo é seguido por um desenvolvimento sexual com a formação dos gametas masculinos e femininos (gametogonia) no epitélio do intestino delgado (FERGUSON, 2002). Após a fertilização, oocistos formados dentro dos enterócitos, são liberados no lúmen intestinal por rompimento das células e excretados como forma não esporulada nas fezes de gatos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O processo de esporogonia ocorre após alguns dias no meio externo. Isso implica uma redução da meiose e mudança morfológica levando a formação de um oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos haploides. A liberação de oocistos começa 3 a 7 dias após a ingestão de cistos teciduais e pode continuar por mais 20 dias. Gatos infectados podem liberar em torno de 100 milhões de oocistos nas fezes (JONES; DUBEY, 2010). Esses podem infectar vários hospedeiros intermediários, praticamente todos os animais de sangue quente, de mamíferos a aves, quando ingeridos juntos aos alimentos ou água. Oocistos também podem infectar outros gatos embora seja menos eficiente (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

No hospedeiro intermediário, o parasito apresenta duas fases no desenvolvimento assexuado. Na primeira fase, após a ingestão do oocisto, esporozoítos são liberados. Eles penetram no epitélio intestinal onde diferenciam em taquizoítos. Esses taquizoítos replicam rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer tipo de célula e disseminam por todo o organismo. A segunda fase começa quando taquizoítos iniciam a conversão para bradizoítos (cisto tecidual) ocorrendo a partir de 7-10 dias após a infecção. Dentro do cisto tecidual, bradizoítos se multiplicam por endodiogenia, e apresentam alta afinidade por tecido muscular e cerebral, contudo, podem ser encontrados em vísceras, tais como pulmão, fígado e rins (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Cisto tecidual é o estágio de vida terminal no hospedeiro intermediário sendo altamente infeccioso e podem permanecer durante toda a vida na maioria dos hospedeiros (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Após a ingestão desses cistos teciduais por um hospedeiro intermediário através de carne crua ou mal cozida, os cistos são rompidos e passam pelo trato digestivo causando a liberação dos bradizoítos. Os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro podendo se diferenciar em taquizoíto disseminando por todo o organismo (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

### 1.6 Cepas de *T. gondii*

Na Europa, América do Norte e África existem três linhagens clonais dominantes de *T. gondii* conhecidas como tipo I, tipo II e a tipo III (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Essas linhagens diferem em sua prevalência, virulência, capacidade migratória dentro do hospedeiro e habilidade para converter em bradizoítos. Expansões dessas linhagens coincidem com a domesticação de gatos, bem como, mudanças na prática agrícola nos últimos anos (SU et al., 2003). Múltiplas infecções com diferentes cepas podem resultar na produção de um número grande de formas recombinantes e atípicas, que são altamente prevalentes na América do Sul onde cepas exóticas, tais como COUG, MAS e CAST são encontradas (LINDSTRÖM et al., 2008; SIBLEY et al., 2009; DUBEY et al., 2011).

Cepas do tipo I (RH, GT1, CAST e VEL) são virulentas em camundongos e podem causar a morte desses animais. Em humanos, a cepa tipo I está associada a manifestações clínicas graves da toxoplasmose, incluindo manifestações oculares atípicas e surtos agudos, além de ser registradas em pacientes com doenças congênitas (APPLEFORD; SMITH, 2000; BOOTHROYD; GRIGG, 2002; GRIGG et al., 2010).

As cepas do tipo II (ME-49, PDS e PLK) e tipo III (VEG e CEP) são significativamente menos virulentos em camundongos e a infecção por essas cepas tendem a cronificar. Cepa tipo II são mais comumente isolado a partir de casos clínicos de toxoplasmose em seres humanos e em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Cepas do tipo III têm sido registradas a partir de isolados de animais (HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002).

Estudos sugerem que em muitos outros lugares do mundo outros genótipos de *T. gondii* predominam (LEHMANN et al., 2006) e que esses outros genótipos possam representar isolados zoonóticos relacionados com espécies de animais não domesticados. Embora esses isolados tenham características de expansão clonal (KHAN et al., 2007), em geral seu genótipo são mais variáveis, sugerindo que o ciclo de vida sexual tem sido mais importante na evolução desses isolados de *T. gondii* (BELFORT-NETO et al., 2007).

### 1.7 Resposta Imune ao parasito

A resposta imunológica a infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Esta variação individual pode ser explicada pelo elevado nível de heterogeneidade no *background* genético dos indivíduos. Além disso, *T. gondii* tem a capacidade de se disseminar por todos os tecidos e cada compartimento tecidual apresenta sua própria resposta imune específica, em particular no sistema nervoso central e na placenta (FILISETTI; CANDOLFI, 2004).

Para manter no hospedeiro, *T. gondii* contém uma série de genes que permitem a invasão de células do hospedeiro, modulação da expressão gênica e evasão da resposta imune. Essas estratégias incluem alterações na expressão e secreção de citocinas imunomodulatórias, alterações na viabilidade celular e bloqueando os mecanismos antimicrobianos. Contudo, *T. gondii* não consegue suprimir totalmente a resposta imune do hospedeiro, e sim, diminuir parcialmente. Portanto, *T. gondii* parece manter um delicado equilíbrio entre a indução e supressão da resposta imune garantindo a sobrevivência tanto do hospedeiro quanto do parasito (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Durante a resposta imune inata, monócitos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) são recrutados para os sítios de infecção sendo necessária para resistência do organismo durante a infecção por *T. gondii*. Uma das funções da resposta imune inata é a capacidade de reconhecer o patógeno e produzir IL-12 que estimulam as células NK e células T a produzirem IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI et al., 1993; HUNTER et al., 1994). IFN- $\gamma$  é o maior mediador de resistência à infecção por *T. gondii* e ativa vários mecanismos intracelulares para eliminar o parasito e inibir sua replicação. Estudos utilizando camundongos deficientes em IL-12 ou IFN- $\gamma$  infectados com *T. gondii* morrem com a doença aguda e não conseguem controlar a carga parasitaria (SUZUKI; ORELLANA, 1988; GAZZINELLI et al., 1994).

Receptores do sistema imune inato tais como os receptores tipo-Toll (TLRs) têm um importante papel no reconhecimento do parasito pelo hospedeiro. Os TLRs específicos envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* incluem TLRs 2, 4, 9, e 11. TLR-11 responde a moléculas tipo profilinas que são conservadas entre parasitos protozoários, enquanto TLRs 2 e 4 reconhecem glicosilfosfatidilinositóis na superfície do parasito (YAROVINSKY et al., 2005; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). Além disso, estudo utilizando camundongos deficientes da molécula adaptadora MyD88, que está envolvida na sinalização intracelular dos TLRs, são suscetíveis a infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* (SCANGA et al., 2002).

*T. gondii* regula a cascata de sinalização do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e interfere com a ativação da proteína quinase associada com mitôgeno (MAPK), resultando no bloqueio transitório da produção de IL-12 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (BUTCHER; DENKERS, 2002). Estudos mostram que *T. gondii* interfere também na atividade transcrricional de STAT1. O parasito interfere com o supressor da via de sinalização das citocinas (SOCs), regulando negativamente a transdução de sinal JAK/STAT prevenindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias (LANG et al., 2006; KIM; FOUTS; BOOTHROYD, 2007).

Monócitos estão envolvidos na resistência durante a toxoplasmose, pois essa população celular contribui para o controle direto de *T. gondii* através da produção de espécies reativas de oxigênio e espécies intermediárias de nitrogênio, inibindo assim a replicação do parasito (DUNAY; SIBLEY, 2010). Além disso, camundongos deficientes no receptor de quimiocina CCR2, que é necessário para o recrutamento de monócitos para os sítios de infecção, exibem aumento na suscetibilidade quando infectados por *T. gondii* (ROBBEN; LAREGINA; KUZIEL, 2005; BENEVIDES et al., 2008). Monócitos também produzem IL-1 em resposta a antígenos solúveis de toxoplasma e esse fator aumenta os mecanismos efetores em macrófagos contra *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1995; HAMMOUDA et al., 1995).

As células NK são outro tipo de população inata envolvida na imunidade contra *T. gondii*. Células NK migram para os tecidos linfoides dos sítios de infecção onde liberam IFN- $\gamma$  ativando os macrófagos e aumentando a expressão de MHC classe II. Camundongos deficientes em CCR5 (receptor de quimiocina envolvido na migração de células NK) infectados com *T. gondii* mostram diminuição no recrutamento de células NK para os sítios de infecção (KHAN et al., 2006). Além disso, estudos com camundongos deficientes de células T mostram que as células NK fornecem um mecanismo limitado de resistência à infecção por *T. gondii* através da produção de IFN- $\gamma$  (DENKERS et al., 1993; SHER et al., 1993; HUNTER et al., 1994).

Durante a resposta imune adaptativa, as células T CD4<sup>+</sup> fornecem várias funções reguladoras em mediar a resistência na toxoplasmose. No estágio inicial da infecção, células T CD4<sup>+</sup> contribuem para resposta de células T CD8<sup>+</sup> e células B através da produção de citocinas, tais como IFN- $\gamma$  ou expressando CD40L, um ligante de CD40 que é expresso em macrófagos e em outras células inatas, ativando mecanismos efetores e fazendo com que essas

células controlem a infecção crônica (REICHMANN et al., 2000; JOHNSON; SAYLES, 2002; LÜTJEN et al., 2006).

Células T CD8<sup>+</sup> podem controlar a infecção por *T. gondii* através da produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$ , interação entre CD40/CD40L ou através da citólise mediada pela perforina em células infectadas do hospedeiro (DENKERS et al., 1997; REICHMANN et al., 2000). Estudo utilizando camundongos deficientes em células T CD8<sup>+</sup> mostra que esses camundongos apresentam um aumento na suscetibilidade para *T. gondii* e morrem aproximadamente 50 dias pós-infecção (DENKERS et al., 1997). A resposta de células T CD8<sup>+</sup> a *T. gondii* é auxiliada por células T CD4<sup>+</sup>, embora estudos mostrem que a depleção de células T CD4<sup>+</sup> não afeta a magnitude da resposta de células T CD8<sup>+</sup> durante os estágios iniciais de expansão e ativação de células T CD8<sup>+</sup>, as células T CD4<sup>+</sup> são necessárias para proliferação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras durante os estágios crônicos da infecção através da liberação de IL-2 (LÜTJEN et al., 2006).

Infecção por *T. gondii* promove a produção de anticorpos e esses podem controlar o parasito. O papel dos anticorpos na imunidade contra *T. gondii* é demonstrado utilizando camundongos  $\mu$ MT (deficientes em células B). Esses camundongos desenvolvem uma resposta normal para IFN- $\gamma$ , contudo morrem 3 a 4 semanas pós-infecção associada com uma alta carga de parasitos no sistema nervoso central (KANG; REMINGTON; SUZUKI, 2000). Esse aumento na suscetibilidade é devido a falta de anticorpos anti-*T. gondii*, pois um estudo mostrou que a transferência passiva de anticorpos confere proteção em camundongos deficientes de células B (JOHNSON; SAYLES, 2002). Anticorpos podem mediar efeitos protetores contra *T. gondii* por vários mecanismos. Estudos *in vitro* mostraram que esses anticorpos podem opsonizar o parasito para fagocitose, bloquear sua invasão e ativar a via clássica do complemento (SCHREIBER; FELDMAN, 1980; ERBE; PFEFFERKORN; FANGER, 1991; VERCAMMEN et al., 1999).

Apesar da literatura nos fornecer muitas informações sobre a resposta imune durante a infecção por *T. gondii*, ainda não tem nada a respeito sobre a associação entre infecção por *T. gondii* e mediadores lipídicos.

## 1.8 Corpos lipídicos

Corpos lipídicos, também são conhecidos como gotículas lipídicas (LDs) ou adipossomos, são organelas citoplasmáticas dinâmicas e funcionalmente ativas envolvidas em diversas funções biológicas, tais como metabolismo lipídico, sinalização celular e tráfego de



membrana, além de serem encontrados em condições inflamatórias, neoplásicas e infecciosas (MURPHY, 2001; MARTIN; PARTON, 2006; MELO; SABBAN; WELLER, 2006). LDs são encontrados em todo tipo celular e desempenham um papel crítico na homeostasia lipídica. Sua estrutura é diferente das outras organelas, enquanto a maioria das organelas tem seu interior aquoso separado do citoplasma por uma bicamada de membrana, LDs contêm um núcleo formado de lipídios neutros delimitados por uma monocamada de fosfolipídios (PRINZ, 2013).

LDs apresentam uma estrutura esférica composta por um núcleo de lipídios neutros contendo ésteres de colesterol, diacilglicerol (DAG) e/ou triacilglicerol (TAG) revestido por uma monocamada de fosfolipídios anfipáticos, com sua cadeia hidrofóbica voltada para o núcleo e sua porção hidrofílica interagindo com o citoplasma (WOLINS; BRASAEMLE; BICKEL, 2006). Os fosfolipídios que compõem a monocamada consistem de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, além disso, o colesterol pode estar presente em pequenas quantidades (TAUCHI-SATO et al., 2002; BARTZ et al., 2007). Na monocamada dos LDs podem ser encontradas distintas proteínas que estão envolvidas na biogênese, tráfego e mobilização dessas organelas. As principais proteínas estruturais presentes na superfície dos LDs são as proteínas da família PAT (perilipin-adipofilina-TIP47) tais como perilipin, proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (ADRP), “tail-interacting protein” de 47 kDa (TIP47) e S3-12 (BLANCHETTE-MACKIE et al., 1995; BRASAEMLE et al., 1997; WOLINS et al., 2003).

Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (ADRP), também conhecida como adipofilina, é uma proteína de 50 kDa conhecida por estar associada à LDs. ADRP foi originalmente encontrada como a maior proteína induzida nos estágios iniciais da diferenciação de adipócitos (JIANG; SERRERO, 1992), embora já se saiba que a proteína ADRP é expressa em uma variedade de tecidos e células (BRASAEMLE et al., 1997; SCHULTZ et al., 2002). Além disso, estudos mostram que o aumento da expressão da proteína ADRP é observado em células THP-1 infectadas com *Mycobacterium leprae* e em macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (TANIGAWA et al., 2008; FEINGOLD et al., 2010).

LDs de diferentes tipos celulares ou obtidos sob diferentes estímulos podem ser divergentes em sua composição proteica e/ou lipídica. Em adipócitos, as principais proteínas encontradas nos LDs nascentes são TIP 47 e S3-12, enquanto que nos LDs maduros a perilipin e ADRP são mais dominantes (WOLINS; BRASAEMLE; BICKEL, 2006). Além disso, em adipócitos o tamanho dos LDs é de aproximadamente 200 µm de diâmetro podendo

ocupar uma grande parte do citoplasma celular, contudo, em outros tipos celulares o tamanho dos LDs varia entre 0.1 – 5  $\mu\text{m}$  diâmetro estando distribuídos pelo citoplasma (SAKA; VALDIVIA, 2012).

Em leucócitos e macrófagos, a acumulação de LDs no citoplasma é induzida por uma variedade de estímulos ambientais, além de desempenhar um importante papel na resposta inflamatória (MURPHY, 2001). Estudos mostraram que os LDs apresentam em sua composição enzimas que estão envolvidas no metabolismo de eicosanóides (DVORAK et al., 1993; BOZZA et al., 1997).

Em células inflamatórias, LDs têm um importante papel na regulação do metabolismo do ácido araquidônico (AA). AA é um ácido graxo polinsaturado essencial com funções de sinalização e precursor das prostaglandinas e leucotrienos, sendo estocado na forma esterificada em LDs (YU et al., 1998). Além disso, LDs compartimentalizam as enzimas que estão envolvidas tanto na liberação do AA que é a fosfolipase A<sub>2</sub>, quanto no metabolismo das prostaglandinas e leucotrienos, a ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX) respectivamente (DVORAK et al., 1993; BOZZA et al., 1997; YU et al., 1998).

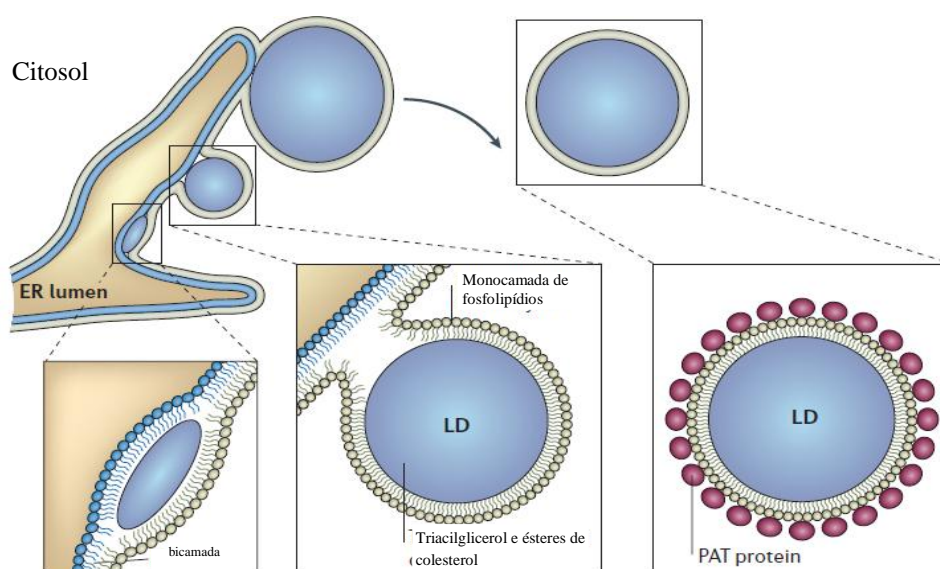
### **1.9 Biogênese e metabolismo dos LDs**

Embora muitos estudos mostrem que os LDs são originados no retículo endoplasmático (ER), existem divergências para explicar como essas organelas são formadas. O modelo clássico de biogênese dos LDs mostra que lipídios neutros são acumulados entre os folhetos citoplasmático e luminal da membrana do ER seguido pelo brotamento dos LDs cercados por uma monocamada de fosfolipídios derivados do folheto citoplasmático da membrana do ER (figura 2) (MURPHY, 2001). Em outro modelo, proposto com leucócitos, LDs seria formado pela incorporação de múltiplas voltas da membrana do ER (ambos os folheto citoplasmático e luminal no desenvolvimento do LDs). O acúmulo de lipídios neutros iria se desenvolver entre as membranas dentro dos LDs (WAN et al., 2007). Uma vez formados, LDs citoplasmáticos são suscetíveis a aumentar seu volume ou por síntese lipídica ou pela fusão entre LDs (KUERSCHNER; MOESSINGER; THIELE, 2008; OLOFSSON et al., 2009).

Lipídios armazenados são mobilizados sob demanda celular de energia pela atividade de lipases específicas e outras enzimas metabólicas. LDs são os locais de localização de enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol e síntese de ácido graxo, indicando que

tanto os passos anabólicos quanto os metabólicos do metabolismo lipídico ocorrem nos LDs (BRASAEMLE et al., 2004; FUJIMOTO et al., 2004).

Proteínas da família PAT são essenciais para o armazenamento e metabolismo de lipídios. No entanto, a origem das proteínas dos LDs e como essas proteínas anexam ou inserem na monocamada de fosfolipídios dos LDs não são completamente compreendidos. Além disso, para as proteínas estruturais e metabólicas, uma diversidade de outras proteínas tem sido identificada dentro dos LDs, sugerindo que de fato os LDs são organelas multifuncionais e sítios de eventos reguladores (MELO et al., 2011a).



**Figura 2.** A formação de corpos lipídicos. No modelo atual de formação de corpos lipídicos, lipídios neutros são sintetizados entre os folhetos da membrana do retículo endoplasmático. OS corpos lipídicos maduros brotam a partir do retículo endoplasmático limitado com uma monocamada de fosfolipídios limitado por proteínas associadas aos corpos lipídicos. As proteínas associadas aos corpos lipídicos são membros da família PAT (perilipin, ADRP e TIP47) (MARTIN; PARTON, 2006).

### 1.10 Interação entre LDs – patógenos

Um aspecto inesperado da biologia dos LDs é sua interação com patógenos. Estudos mostram que existem muitos agentes patogênicos que são associados com a formação de LDs, tais como vírus, fungos, bactérias intracelulares e protozoários patogênicos. Embora à primeira vista não fizesse sentido que essas organelas seriam alvos para patógenos que procuram fontes de lipídios a partir do hospedeiro, novas evidências sugerem que LDs podem também ser mediadores centrais das repostas imunes (SAKA; VALDIVIA, 2012).

Em experimentos com *Mycobacterium bovis* foi encontrado que esse patógeno é capaz de induzir a formação de LDs em dose e tempo dependente em macrófagos pleurais

(D'AVILA et al., 2006). Acumulação de LDs também é identificada no interior de macrófagos da derme (MATTOS et al., 2010) e em células de Schwann de pacientes com hanseníase (MATTOS et al., 2011). LDs também estão envolvidos na esteatose hepática causada pelo vírus da hepatite C. LDs são alvos de proteínas do núcleo viral e podem representar o local para iniciar a montagem e produção de partículas virais novas (MCLAUCHAN, 2009). Além disso, aumento de LDs são observados em macrófagos e hepatócitos durante a infecção pelo vírus da dengue (DENV) (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2010).

Acumulo de LDs a partir de infecções bacterianas e fúngicas são sítios de localização de 5-LO e COX-2 durante a infecção por *Histoplasma capsulatum* e *Mycobacterium bovis* (D'AVILA et al., 2006; SORGI et al., 2009). Aumento na formação de LDs em leucócitos tem sido correlacionado com um significativo aumento na capacidade dessas células em gerar PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>, sugerindo que os LDs são estruturas de resposta rápida envolvidas na produção de mediadores inflamatórios durante infecções (BOZZA et al., 2009).

Infecções parasitárias também mostram um aumento na formação de LDs. A infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* induz um aumento tanto do número quanto no tamanho dos LDs em macrófagos cardíacos e peritoneais no sexto e décimo segundo dia de infecção (MELO et al., 2003). Além disso, camundongos infectados com *Plasmodium berghei* apresentam em suas células hepáticas uma grande quantidade de LDs. (RODRÍGUEZ-ACOSTA et al., 1998).

Formação de LDs em leucócitos inflamatórios constitui sítios para a produção de mediadores inflamatórios (eicosanoides). LDs em macrófagos inflamatórios estão correlacionados com aumento da geração da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) na doença de Chagas (MELO et al., 2003). Além disso, LDs formam o local predominante para a síntese de PGE<sub>2</sub> em macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* (D'AVILA et al., 2006). LDs são também estabelecidos como maior local intracelular para formação de leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) em eosinófilos durante condições alérgicas (BANDEIRA-MELO; PHOOFULO; WELLER, 2001), bem como formação de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) em neutrófilos e macrófagos durante a sepsis (PACHECO et al., 2002; PACHECO et al., 2007).

Muitos estudos tem avaliado a associação entre a formação de LDs e infecções por protozoários, contudo o papel exato dos LDs ainda permanece contraditório, pois alguns trabalhos mostram que os LDs podem servir como fontes de lipídios para a sobrevivência e multiplicação do parasito e outros estudos mostram que os LDs são fontes de mediadores inflamatórios. Apesar de conhecer essa associação entre muitos protozoários, ainda falta estudos avaliando a associação entre a formação dos LDs e a infecção por *T. gondii*.

## 2. Justificativa

Considerando que os corpos lipídicos são organelas funcionalmente dinâmicas e que estão envolvidos em processos de infecção por patógeno intracelular e podem ser fontes de lipídios envolvidos com a replicação do *T. cruzi* e, além disso, os corpos lipídicos são fontes de mediadores inflamatórios, este trabalho se justifica pela necessidade de melhorar o entendimento sobre os mecanismos de controle da infecção por *Toxoplasma gondii* a partir dos corpos lipídicos e consequentemente mediadores lipídicos, ou se por outro lado a presença desses contribuiria para proliferação do parasito através do fornecimento de membrana para sua multiplicação.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho experimental foi analisar a influência dos corpos lipídicos durante a infecção por *Toxoplasma gondii* em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar, comparativamente, a formação dos corpos lipídicos em células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) e não hematopoiéticas (NIH/3T3) infectadas por *Toxoplasma gondii*;
- Avaliar, comparativamente, a influências das cepas tipo I (RH) e tipo II (ME-49) de *T. gondii* na indução da formação de corpos lipídicos;
- Verificar se o tratamento com ácido acetilsalicílico inibe a formação de corpos lipídicos durante a infecção por ambas as cepas de *T. gondii*;
- Verificar se a inibição da formação dos corpos lipídicos pelo ácido acetilsalicílico influencia no parasitismo celular;
- Verificar se a influência das cepas tipo I (RH) e tipo II (ME-49) de *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Cultura celular**

Linhagens celulares murino do tipo macrófagos RAW 264.7 e J774. 1, fibroblastos NIH/3T3 e linfócitos L12L10 foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Os macrófagos e fibroblastos foram cultivados separadamente em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para obtenção de interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), linfócitos L12L10 foram cultivados em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.2 Parasitos**

Cepas RH e ME-49 de *T. gondii* foram mantidas na linhagem de células epiteliais uterinas humanas (HeLa) cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) suplementado com 2% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (todos reagentes da Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Os parasitos foram mantidos por passagem seriada em intervalos regulares de 48 horas e incubados em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3 Avaliação dos LDs por microscopia de luz**

As células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3 foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas e ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pela coloração com azul de tripan. Após o ajuste para uma concentração de  $3 \times 10^4$  células a cada 200  $\mu$ L de meio, as células foram plaqueadas em placas

de cultura de 24 poços sobre lamínulas circulares de 13 mm e incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Nas lamínulas com as células aderidas foram adicionados taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH ou ME-49, na proporção de 5 parasitos por célula (5:1) durante três horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Um grupo de células foi tratado com IFN- $\gamma$  numa concentração de 1.5 ng/mL. Como controle as células foram incubadas somente com meio completo. Após período de infecção as células foram lavadas com meio completo para remoção dos parasitos não aderentes e incubadas por mais 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para identificar os corpos lipídicos, as células foram fixadas em formol a 3,7% diluído em HBSS livre de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (pH 7.4) por 10 minutos e coradas com *oil red O*, como descrito por MELO e colaboradores (2011b). As células foram lavadas com propileno glicol 100% por 5 minutos a temperatura ambiente. Logo após as células foram incubadas com *oil red O* (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) durante 10 minutos a 60° C. Em seguida, as células foram lavadas com propileno glicol 85% por 5 minutos a temperatura ambiente e lavadas duas vezes com água destilada. As células foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos e montadas em meio aquoso.

As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz e as células que apresentavam corpos lipídicos foram quantificadas a cada 200 células examinadas utilizando objetiva de 100x. As imagens foram adquiridas utilizando o programa LAS EZ (LAS EZ, Leica, Wetzlar, Germany).

#### **4.4 Inibição da formação dos LDs**

As células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3 foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas e ressuspensas em 1ml de meio com soro e contadas em câmara de Neubauer. Após o ajuste para uma concentração de  $3 \times 10^4$  células a cada 200  $\mu$ L de meio, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços sobre lamínulas circulares de 13 mm e incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Nas lamínulas com as células aderidas foram adicionados taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH ou ME-49, na proporção 5:1 durante três horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de infecção as células foram lavadas com meio completo para remoção dos parasitos não aderentes e tratadas com ácido acetilsalicílico (aspirina®, Bayer) na concentração de 5  $\mu$ M durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3 infectadas



com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* não tratadas com aspirina foram utilizadas como controle da reação.

Para verificar a inibição dos LDs, as células foram fixadas em formol a 3,7% diluído em HBSS livre de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (pH 7.4) por 10 minutos e coradas pela coloração de *oil red O*, conforme descrito acima. As lamínulas foram analisadas sob microscópio de luz e as células que apresentavam corpos lipídicos foram quantificadas a cada 200 células examinadas utilizando objetiva de 100x. As imagens foram adquiridas utilizando o programa LAS EZ (LAS EZ, Leica, Wetzlar, Germany).

#### **4.5 Coloração de hematoxilina e eosina**

Células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3 foram cultivadas e infectadas com ou sem tratamento com aspirina, como descrito acima. Após a fixação em formol a 3,7% diluído em HBSS livre de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (pH 7.4) por 10 minutos, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato 1X (PBS). Em seguida, as células foram incubadas com álcool 100% e 70% durante 1 minuto cada. As células foram coradas com hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra coradas com eosina por 1 minuto, depois as células foram lavadas com uma solução de álcool 100% e ácido acético glacial na proporção de 2:1 (v/v) durante 1 minuto e 20 segundos. As células foram lavadas novamente em álcool 100% duas vezes e montadas utilizando Entelan.

As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz com objetiva de 100x. As células infectadas foram quantificadas a cada 200 células examinadas e o número de parasitos foram contados a cada 200 células analisadas. As imagens foram adquiridas utilizando o programa LAS EZ (LAS EZ, Leica, Wetzlar, Germany).

#### **4.6 Imunohistoquímica para detecção da proteína ADRP**

Células cultivadas e infectadas, como descrito acima, foram lavadas em PBS 1X e fixadas com uma solução fixadora (4% de paraformaldéido e 0,0075% de glutaraldéido diluídos em PBS 1X, pH 7,4) durante 30 minutos. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com 0,05% de saponina por 15 minutos a temperatura ambiente. Os sítios não específicos foram bloqueados com solução Q-PBS (0,01% de saponina, 2% de BSA diluídos em PBS 1X, pH 7,4) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-ADRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) na concentração de 1/150 diluído em Q-PBS durante 1 hora a temperatura

ambiente. Após o tempo, as células foram lavadas com Q-PBS e incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com CF488A (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) na concentração de 1/300 e o núcleo foi marcado usando de TOPRO-3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) na concentração de 1/2000 durante 1 hora a temperatura ambiente, ambos diluídos em Q-PBS. Após a incubação, as células foram lavadas novamente em Q-PBS e montadas utilizando o reagente antifade SlowFade Gold (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram analisadas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

#### **4.7 Análise Estatística**

Análise estatística foi feita usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, Mann Whitney e teste  $t$  quando apropriado. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

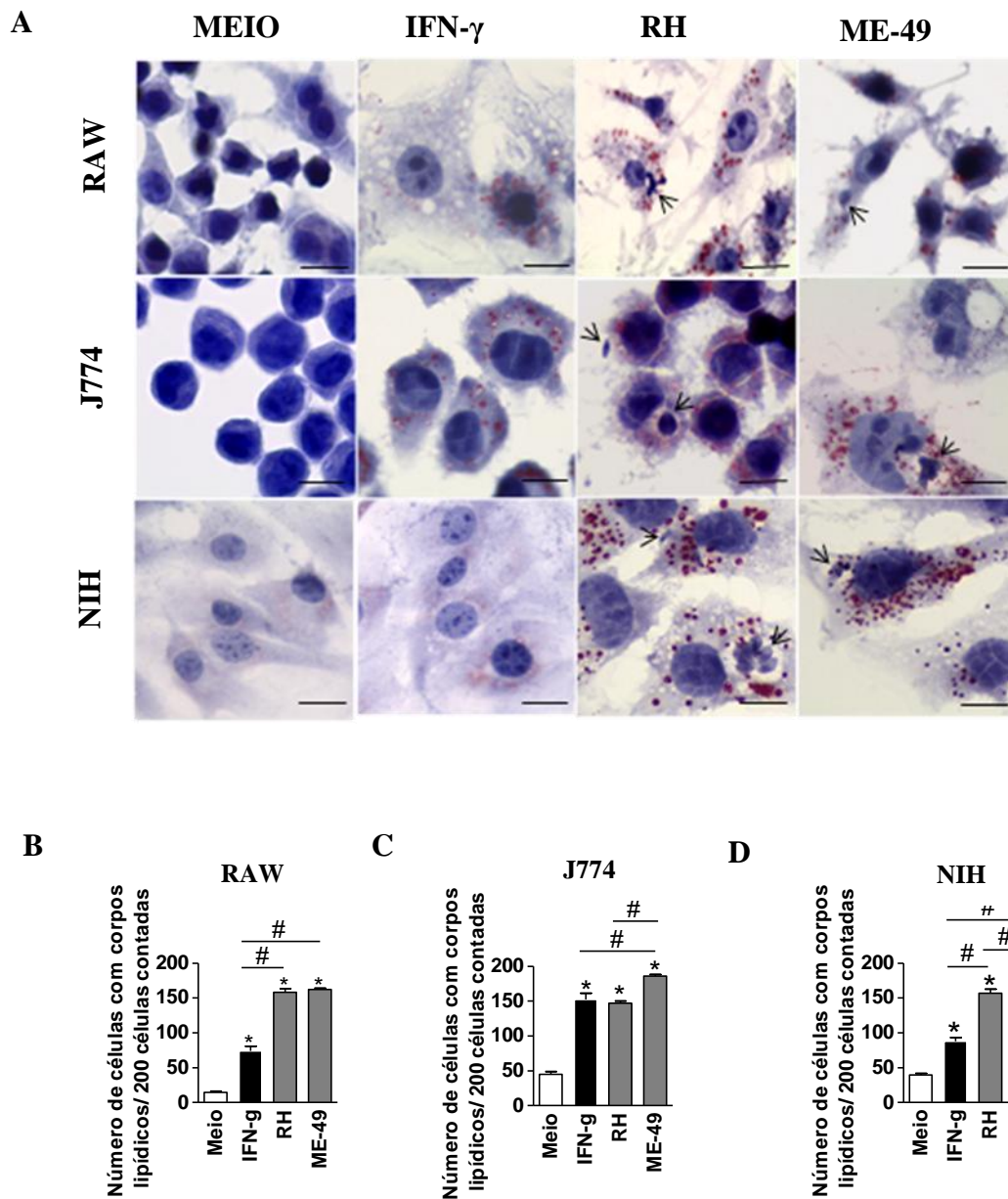
## 5. Resultados

### 5.1 Infecção por *T. gondii* induz a formação de corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.

Para verificar se a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir a formação de LDs e se a cepa tipo I ou II do parasito influencia nessa formação, macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) e fibroblastos (NIH/3T3) foram infectados com a cepa RH ou ME-49 e as células que apresentavam em seu citoplasma LDs foram quantificadas. Células hematopoiéticas e não hematopoiéticas apresentam LDs citoplasmáticos normalmente (figura 3A). O estímulo com IFN- $\gamma$  induziu 5 vezes mais, e a infecção com a cepa RH ou ME-49 induziu 11 vezes mais a formação de LDs nos macrófagos RAW 264.7 quando comparadas com o meio (figura 3B). O estímulo com IFN- $\gamma$  e a infecção pela cepa RH foram capazes de induzir altos e similares níveis de formação de LDs, 3,4 vezes mais que o tratamento com meio nos macrófagos J774.1 (figure 3C). A cepa ME-49 induziu níveis de formação de LDs 4 vezes maiores que o tratamento com o meio quando comparado com o estímulo com IFN- $\gamma$  ou com a infecção com a cepa RH em macrófagos J774.1 (figura 3C).

Nas células não hematopoiéticas, fibroblastos NIH/3T3, o estímulo com IFN- $\gamma$  também induziu 2 vezes mais a formação dos LDs quando comparados com as células tratadas com meio (figura 3D) e altos níveis de formação de LDs, 4 e 5 vezes mais elevados foram detectados nas células infectadas com as cepa RH ou ME-49, respectivamente (figura 3D). Nota-se que a infecção com a cepa ME-49 induz níveis maiores de formação de LDs quando comparados com a cepa RH (figura 3D).

Portanto, *T. gondii* é capaz de induzir a formação dos LDs tanto em células hematopoiéticas quanto em células não hematopoiéticas. Além disso, a cepa ME-49 é capaz de induzir altos níveis de formação de LDs em células hematopoiética (J774.1) e não hematopoiéticas (NIH/3T3) quando comparada com a cepa RH.



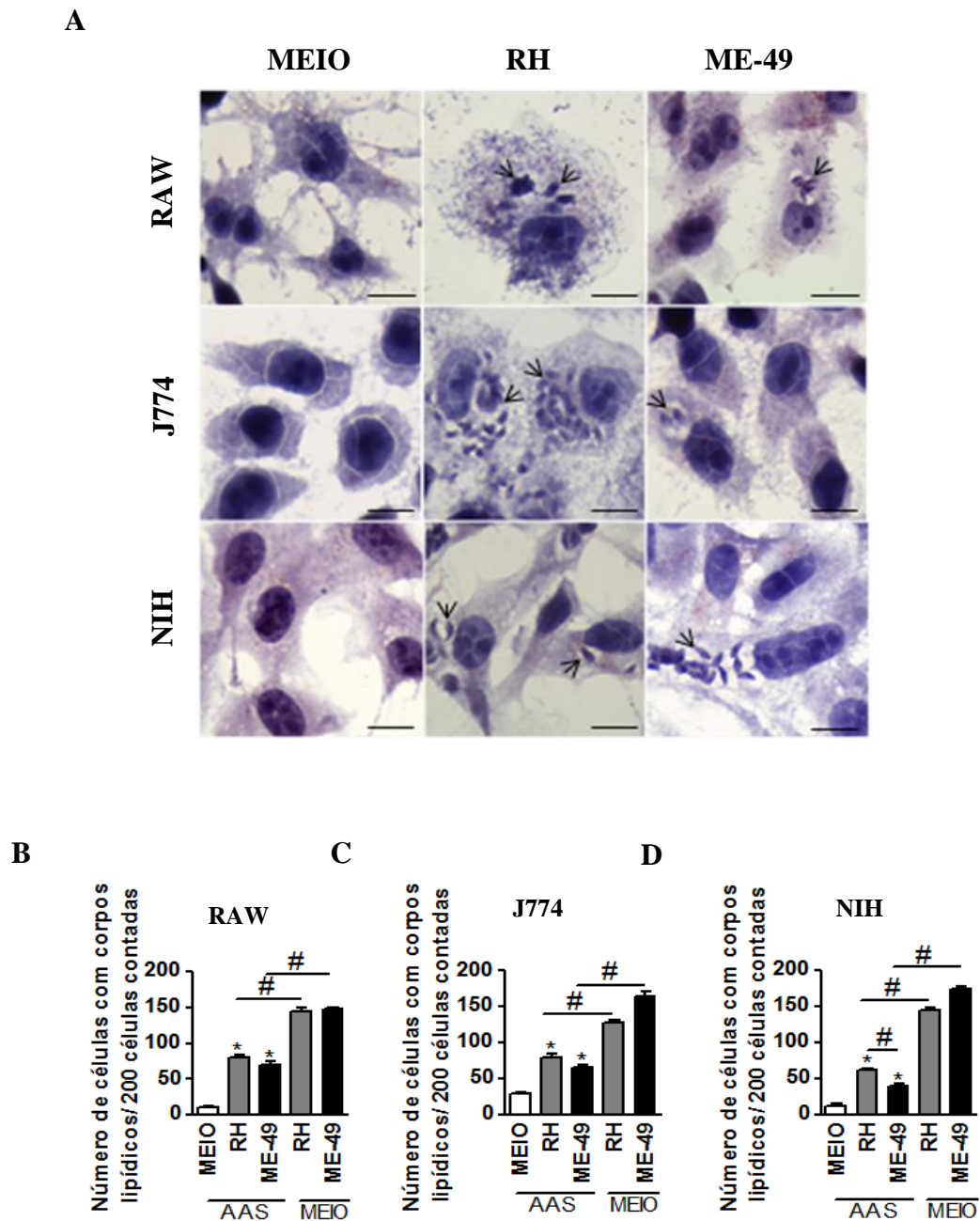
**Figura 3.** Infecção por *T. gondii* induz a formação de corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. (A) Fotomicrografia representativa da formação dos corpos lipídicos em macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) e fibroblastos (NIH/3T3) infectados com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* a uma proporção de 5 parasitos/célula ou tratados com IFN- $\gamma$  (1,5 ng/mL) durante 24 horas e corados pela coloração de *oil red O* para detecção dos corpos lipídicos. As setas pretas indicam os parasitos. O número de células com corpos lipídicos foi quantificado por 200 células examinadas em (B) RAW 264.7, (C) J774.1 e (D) NIH/3T3. \*Diferença estatisticamente significativa entre a infecção ou tratamento em relação ao meio. # Diferença estatisticamente significativa entre a infecção e o tratamento. ANOVA e pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Escala das barras = 10 $\mu$ m.

## **5.2 A formação dos corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas é inibida pelo ácido acetilsalicílico**

Para determinar se a formação dos LDs estava envolvida com a infecção por *T. gondii*, macrófagos (RAW 264.7 e J774. 1) e fibroblastos (NIH/3T3) foram infectados com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* e tratados com ácido acetilsalicílico (AAS) durante 24 horas após infecção. Após 24 horas de tratamento ou 48 horas de infecção, observou-se uma diminuição na formação dos LDs em todas as linhagens celulares infectadas com a cepa RH ou ME-49 (figura 4A). Macrófagos RAW 264.7 apresentaram uma diminuição na formação de LDs com o tratamento com AAS. O tratamento diminui os LDs tanto na infecção com a cepa RH quanto com a cepa ME-49 quando comparados com as células infectadas e não tratadas ( $p < 0,0286$ ) (figura 4B). O mesmo perfil de inibição foi observado nos macrófagos J774.1 quanto comparados com seu controle não tratado ( $p < 0,0286$ ) (figura 4C).

Nos fibroblastos NIH/3T3 a formação dos LDs também diminuiu após o tratamento com AAS em ambas as infecções (RH ou ME-49) ( $p < 0,0286$ ). Na infecção com a cepa ME-49 observou-se uma maior inibição dos LDs quando comparados com a cepa RH ( $p < 0,0286$ ) (figura 4D). Além disso, os fibroblastos mostraram uma tendência em formar menos LDs quando tratados com AAS em comparação com os macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) na infecção pelas cepas RH ou ME-49 de *T. gondii*.

Logo, a formação dos LDs durante a infecção por *T. gondii* pode ser inibida pelo tratamento com AAS. Além disso, o efeito do AAS conforme nossos dados é mais significativo em células não hematopoiéticas (NIH/3T3) infectadas com a cepa RH.

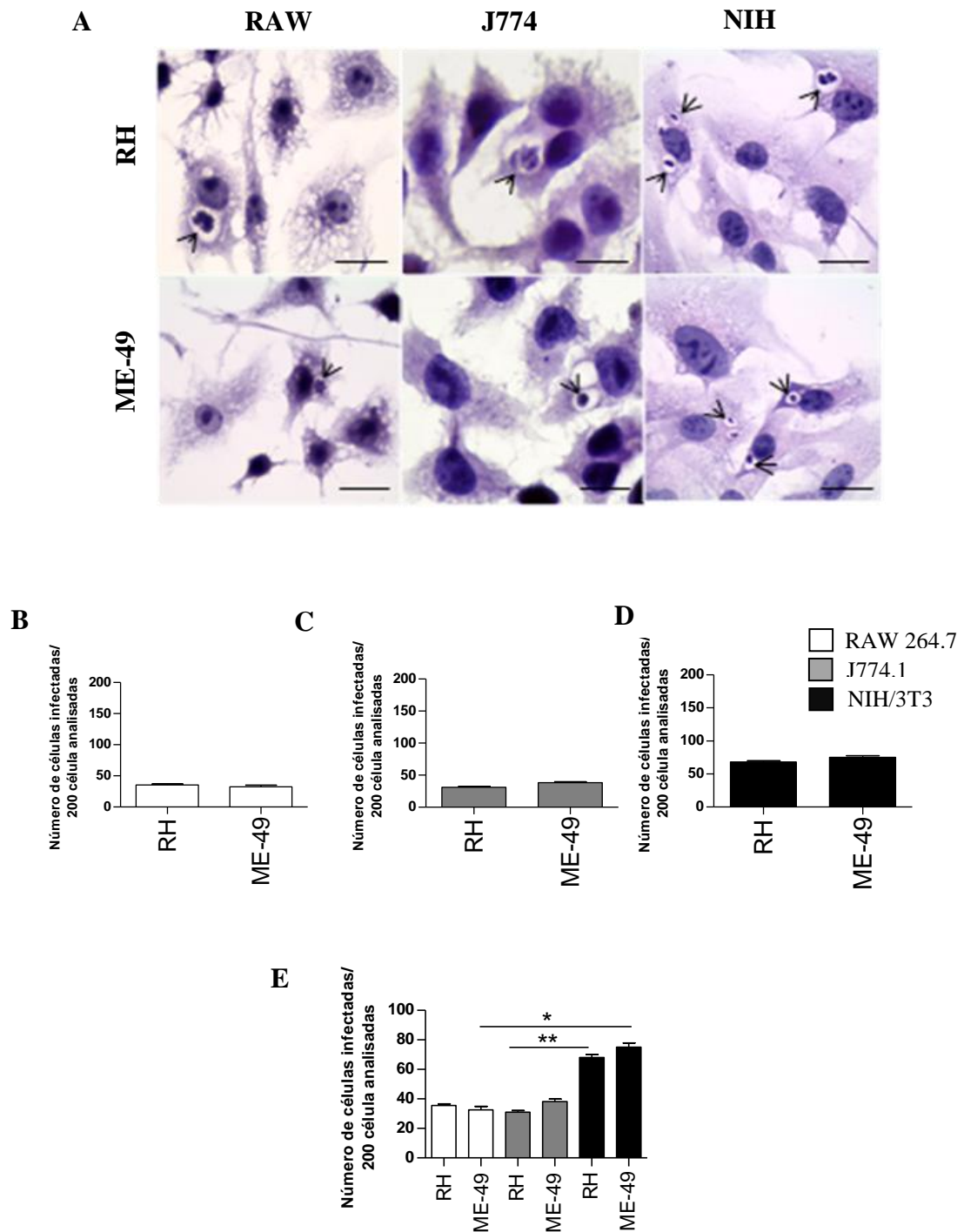


**Figura 4.** Corpos lipídicos são inibidos através do tratamento com ácido acetilsalicílico. (A) Fotomicrografia representativa da inibição dos corpos lipídicos em macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) e fibroblastos (NIH/3T3) infectados com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* a uma proporção de 5 parasitos/célula durante 24 horas, tratados com ácido acetilsalicílico (AAS) na concentração de 5  $\mu$ M e corados pela coloração de *oil red O* para detecção dos corpos lipídicos. As setas pretas indicam os parasitos. O número de células com corpos lipídicos foi quantificado por 200 células examinadas em (B) RAW 264.7, (C) J774.1 e (D) NIH/3T3. \*Diferença estatisticamente significativa entre a infecção e o meio. # Diferença estatisticamente significativa entre as infecções. Teste de Mann Whitney,  $p < 0,05$ . Escala das barras = 10 $\mu$ m.

### 5.3 Fibroblastos são mais suscetíveis à infecção por *T. gondii*

O próximo passo era analisar se os altos níveis de células formando LDs estavam envolvidos com a quantidade de células infectadas pelas cepas RH e ME-49 de *T. gondii*. Macrófagos RAW 264.7 e J774.1 apresentaram índices similares de infecção quando infectados com a cepa RH ou ME-49, e não se observou diferença estatística entre cepas (figura 5A,B,C). A quantidade de fibroblastos NIH/3T3 infectados foi maior que macrófagos e não se observou diferenças quando essas células foram infectadas com as cepas RH ou ME-49 (figura 5D).

No entanto, diferença estatística só foi encontrada entre macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos NIH/3T3 quando infectados pela cepa ME-49 ( $p < 0,05$ ) e em macrófagos J774.1 e fibroblastos NIH/3T3 quando infectados com a cepa RH ( $p < 0,05$ ). Sugere-se que essa diferença em termos de formação de LDs e porcentagem de células infectadas visto nas linhagens celulares infectadas por *T. gondii* pode ser explicada pela produção e liberação no meio de mediadores inflamatórios.



**Figura 5.** Fibroblastos são mais suscetíveis a infecção por *T. gondii*. (A) Fotomicrografia representativa da infecção pelas cepas RH ou ME-49 em macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) e fibroblastos (NIH/3T3) a uma proporção de 5 parasitos/célula durante 24 horas e corados com Hematoxilina e eosina. As setas pretas indicam os parasitos. O número de células infectadas foi quantificado por 200 células analisadas em (B) RAW 264.7, (C) J774.1 e (D) NIH/3T3. \*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados com a cepa ME-49,  $p < 0,05$ . \*\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados com a cepa RH. Teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's,  $p < 0,05$ . Escala das barras = 10 $\mu$ m.



#### **5.4 A inibição da formação dos corpos lipídicos aumenta a virulência por *T. gondii***

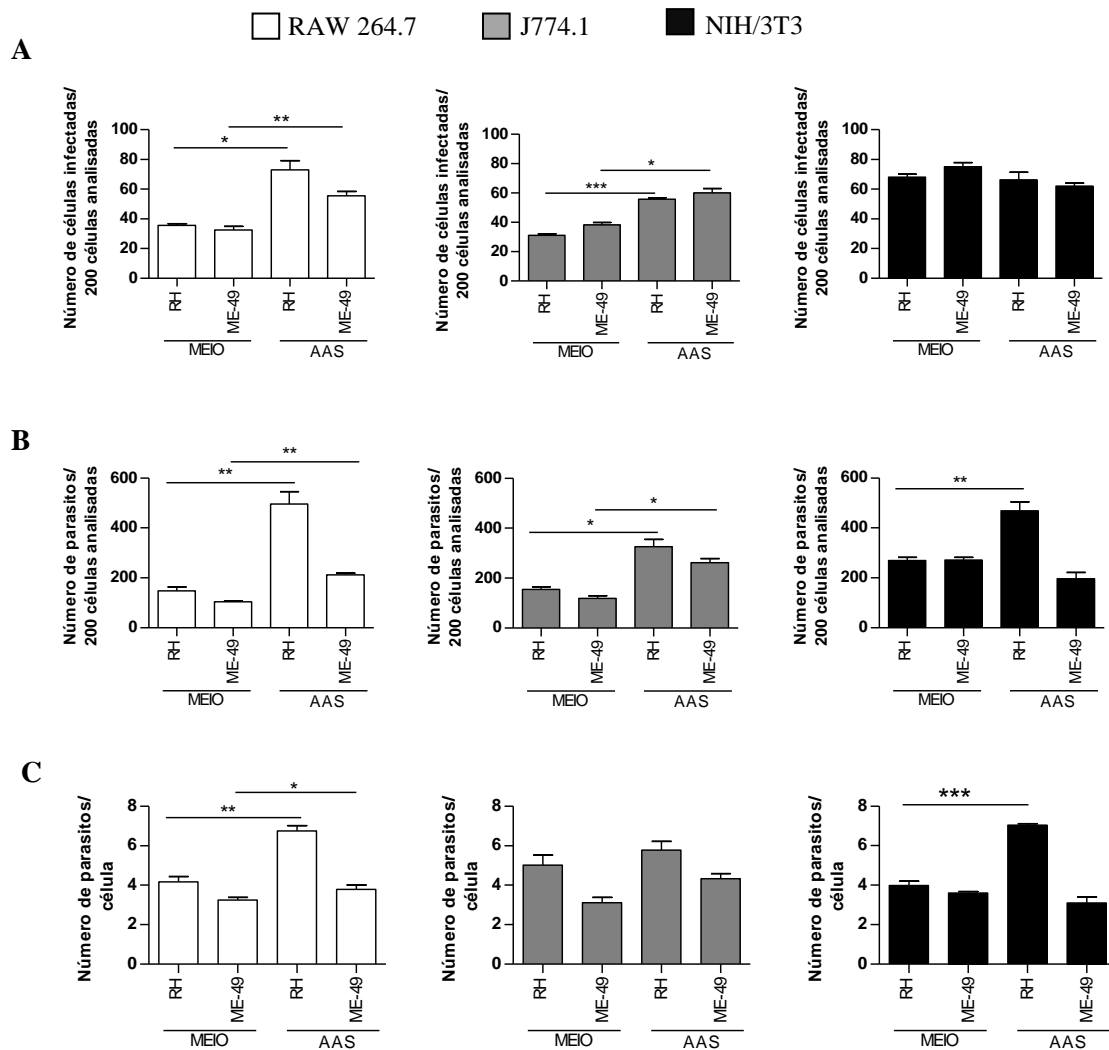
Para verificar se os LDs estão envolvidos no controle do parasito ou se eles servem como fontes de lipídicos para a multiplicação parasitária, as células (RAW 264.7 e J774.1) infectadas com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* foram tratadas com o ácido acetilsalicílico (AAS). As células foram quantificadas, bem como o número total de parasitos nos macrófagos e fibroblastos.

Observamos que o tratamento com o ácido acetilsalicílico induziu um maior número de macrófagos RAW 264.7 e J774.1 infectados por ambas as cepas quando comparado com o macrófagos controles infectados e não tratados (figura 6A). Apesar da maior quantidade de células infectadas, os macrófagos não apresentaram divergência entre a infecção pelas cepas RH ou ME-49. Macrófagos RAW 264.7 infectados com a cepa RH e tratado com AAS apresentaram uma tendência em serem mais infectados quando comparados com a cepa ME-49 e com macrófagos J774.1 infectados com a cepa RH ou ME-49. No entanto, os fibroblastos NIH/3T3 não mostram diferença estatística na quantidade de células infectadas após o tratamento com AAS (figura 6A).

O número de parasitos também foi aumentado após o tratamento com AAS. Macrófagos RAW 264.7 e J774.1 apresentaram maior quantidade de parasitos após o tratamento com AAS em relação ao grupo infectado e não tratado (figura 6B). Nas duas linhagens de macrófagos a infecção pela cepa RH mostrou uma maior quantidade de parasitos em relação à cepa ME-49, além disso, a infecção com a cepa RH nas células RAW 264.7 após o tratamento teve níveis altos de parasitos (figura 6B). Nos fibroblastos apenas a infecção com a cepa RH mostrou um aumento na quantidade de parasitos após o tratamento (figura 6B).

A multiplicação dos parasitos foi aumentada nos macrófagos RAW 264.7 infectados com as cepas RH e ME-49 e nos fibroblastos NIH/3T3 infectados com a cepa RH após o tratamento com AAS. Contudo, macrófagos J774.1 não apresentaram diferença estatística na quantidade de parasitos por célula nas infecções pelas cepas RH ou ME-49 (figura 6C).

Os dados sugerem que a formação dos LDs durante a infecção por *T. gondii* parece regular a multiplicação de parasitos em macrófagos, pois a sua inibição aumentou os níveis de células infectadas e a quantidade de parasitos em células hematopoiéticas (macrófagos RAW 264.7 e J774.1). Apesar da inibição dos LDs não afetar a quantidade de células não hematopoiéticas infectadas (fibroblastos NIH/3T3), o número de parasitos da cepa RH é aumentado após a inibição por ASS.



**Figura 6.** A inibição dos corpos lipídicos aumenta a virulência por *T. gondii*. (A) Quantificação de células infectadas com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* em macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) e fibroblastos (NIH/3T3) a uma proporção de 5 parasitos/célula e tratados com ácido acetilsalicílico (AAS) na concentração de 5 μM durante 24 horas. (B) Quantificação do número de parasitos em 200 células analisadas. (C) Avaliação da multiplicação dos parasitos em 200 células analisadas.

\*, \*\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Teste t *paired*,  $p < 0,05$ .

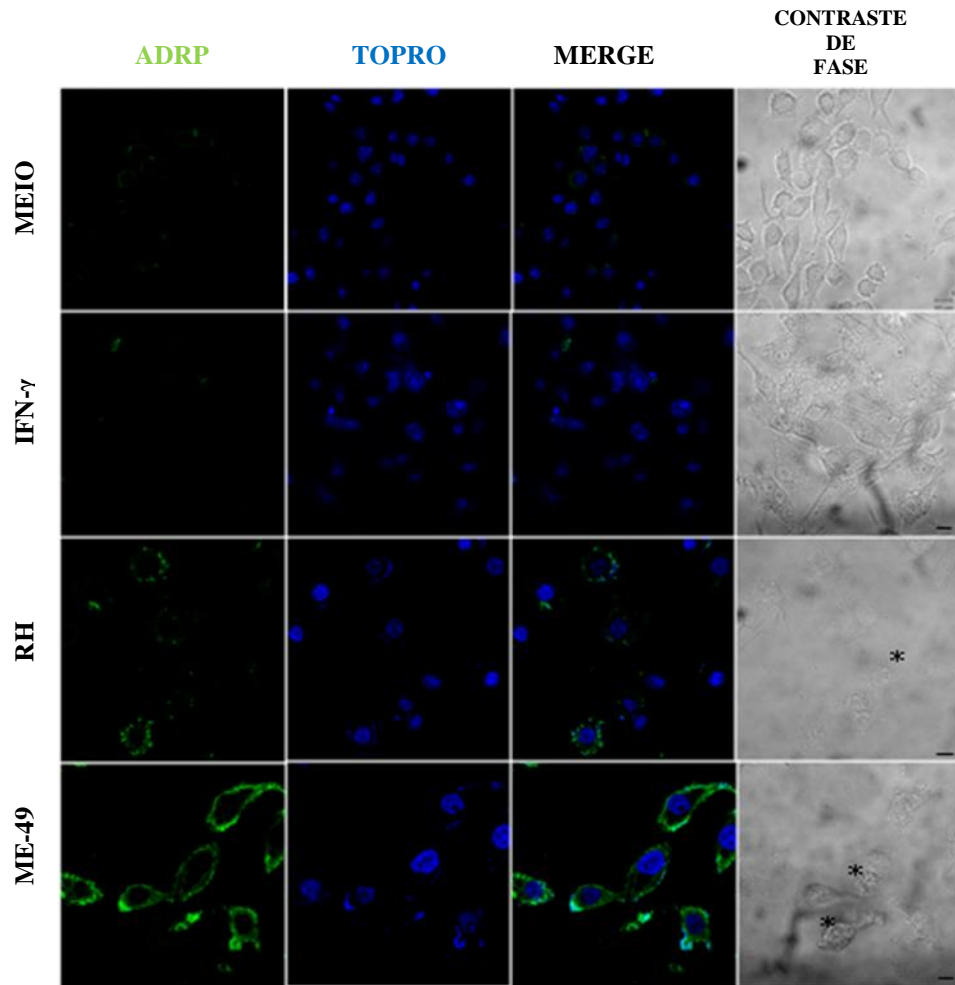
### **5.5 Infecção por *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas**

Para determinar se a proteína ADRP está sendo expressa na membrana do LDs durante a infecção por *T. gondii*, reação de imunofluorescência foi realizada nos macrófagos RAW 264.7 e J774.1 e fibroblastos NIH/3T3 infectados com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* ou tratados com IFN- $\gamma$  para detecção da proteína.

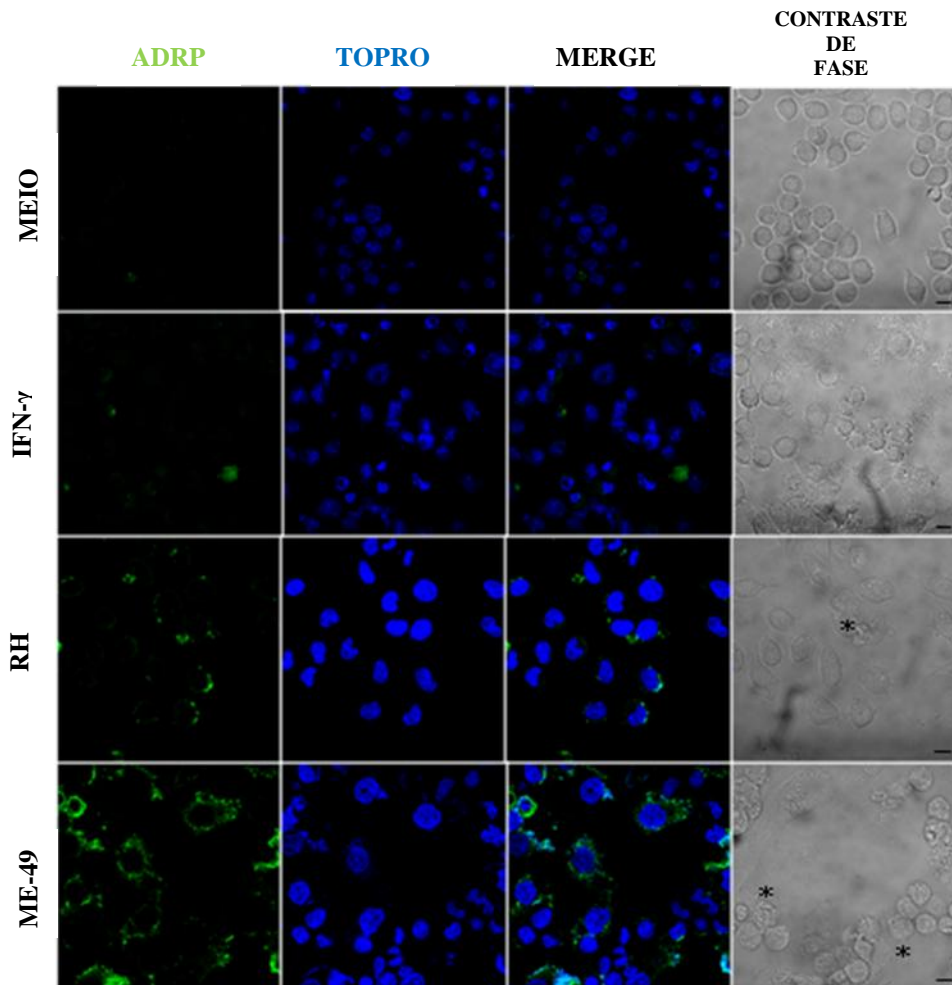
Foi observado que a expressão de ADRP é pequena em macrófagos RAW 264.7 e J774.1 quando tratados com IFN- $\gamma$  (figuras 7,8), contudo, a infecção com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* aumentaram a expressão da proteína ADRP nesses macrófagos (figuras 7,8). Além disso, a infecção com a cepa ME-49 em macrófagos RAW 264.7 e J774.1 induziu maior expressão da proteína ADRP comparada com células tratadas com IFN- $\gamma$  ou infectadas com a cepa RH (figuras 7,8).

A expressão da proteína ADRP também foi pequena nos fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com IFN- $\gamma$  ou infectados com a cepa RH (figura 9). Contudo, quando as células NIH/3T3 foram infectadas com a cepa ME-49 foi observado um aumento na expressão da proteína ADRP de acordo com os altos níveis de formação dos LDs (figura 3D; figura 9).

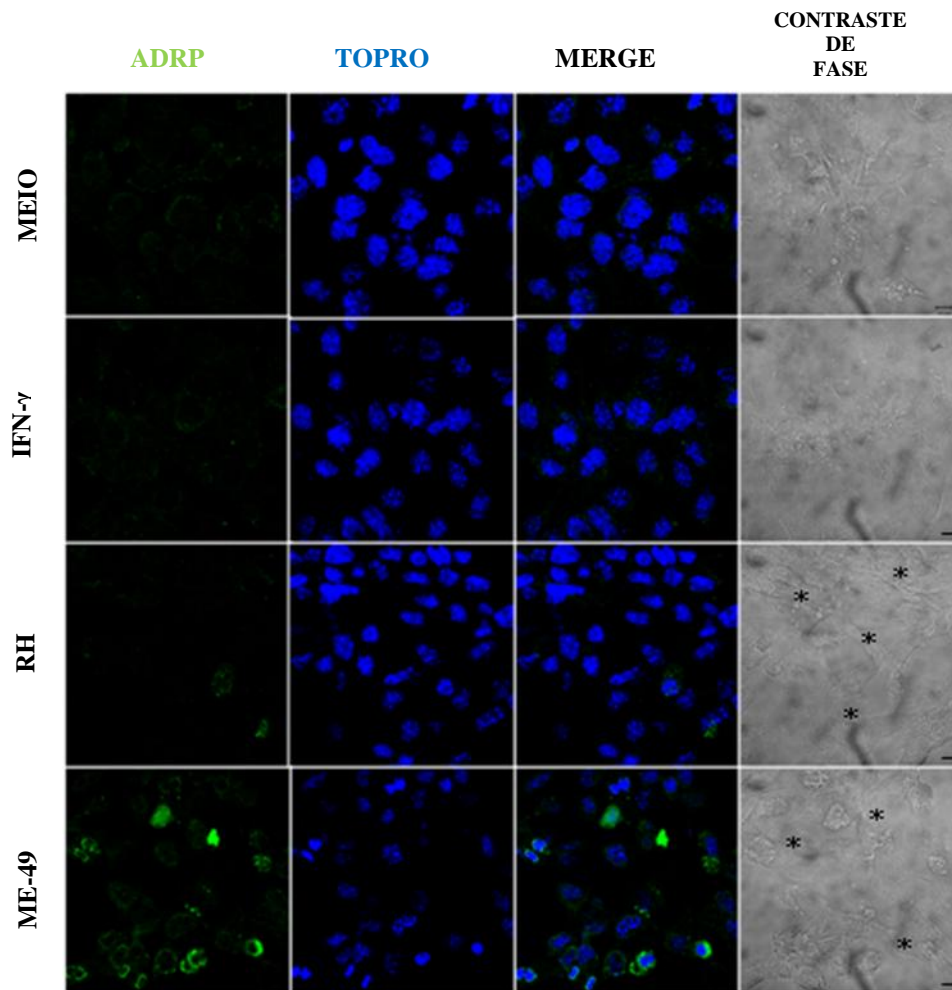
Portanto, nossos resultados sugerem que a expressão da proteína ADRP está envolvida com a formação de LDs independente a linhagem celular quando as células são infectadas com as cepas RH e ME-49 de *T. gondii*, mas principalmente com a cepa ME-49.



**Figura 7.** A infecção por *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP em macrófagos RAW 264.7. Imagem de microscopia confocal da expressão da proteína ADRP em macrófagos RAW 264.7 infectados com a cepa RH ou ME-49 de *T. gondii* em uma proporção de 5 parasitos/célula ou tratados com IFN- $\gamma$  (1,5 ng/mL) durante 24 horas . Imunofluorescência foi realizada utilizando anticorpo anti-ADRP (verde) e o DNA nuclear marcado com iodeto de TOPRO-3 (azul). \*Indica os parasitos. Escala das barras = 10  $\mu$ m.



**Figura 8.** A infecção por *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP em macrófagos J774.1. Imagem de microscopia confocal da expressão da proteína ADRP em macrófagos J774.1 infectados com a cepa RH ou ME-49 de *T. gondii* em uma proporção de 5 parasitos/célula ou tratados com IFN- $\gamma$  (1,5 ng/mL) durante 24 horas. Imunofluorescência foi realizada utilizando anticorpo anti-ADRP (verde) e o DNA nuclear marcado com iodeto de TOPRO-3 (azul). \*Indica os parasitos. Escala das barras = 10  $\mu$ m.



**Figura 9.** A infecção por *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP em fibroblastos NIH/3T3. Imagem de microscopia confocal da expressão da proteína ADRP em fibroblastos NIH/3T3 infectados com a cepa RH ou ME-49 de *T. gondii* em uma proporção de 5 parasitos/célula ou tratados com IFN- $\gamma$  (1,5 ng/mL) durante 24 horas. Imunofluorescência foi realizada utilizando anticorpo anti-ADRP (verde) e o DNA nuclear marcado com iodeto de TOPRO-3 (azul). \*Indica os parasitos. Escala das barras = 10  $\mu$ m.

## 6. Discussão

Alterações no metabolismo lipídico e aumento do número de corpos lipídicos intracelular estão associados com muitas doenças inflamatórias causadas por agentes patogênicos intracelulares, tais como bactérias (D'AVILA et al., 2006; MATTOS et al., 2010), fungos (SORGI et al., 2009) e infecções parasitárias por *Leishmania amazonensis* (PINHEIRO et al., 2009), *Trypanosoma cruzi* (D'AVILA et al., 2011), *Plasmodium berghei* (RODRÍGUEZ-ACOSTA et al., 1998) e *Plasmodium falciparum* (JACKSON et al., 2004).

Embora o aumento na formação dos LDs seja encontrado em células do hospedeiro durante a infecção com vários agentes patogênicos, os mecanismos de biogênese da formação dos LDs e o seu papel na patogênese durante a infecção por *T. gondii* não são totalmente compreendidos.

Estudos recentes mostraram que a formação dos LDs está envolvida na multiplicação de *T. cruzi* (D'AVILA et al., 2011), por outro lado, a colocalização entre os LDs com a 5-lipoxigenase, bem como a sua indução é dependente de 5-lipoxigenase e TLR-2 na infecção por *Histoplasma capsulatum*, sugere que essas organelas ricas em lipídios estão envolvidas na proteção do hospedeiro (SORGI et al., 2009). Na infecção por *Toxoplasma gondii*, observou-se que os corpos lipídicos parecem proporcionar uma fonte de lipídios para a biogênese das membranas do parasito (CHARRON; SIBLEY, 2002). Contudo ainda não é conhecido se os LDs estão envolvidos na resposta imune inata contra a infecção por *T. gondii* e a influência do tipo de cepa do parasito na formação dos LDs.

Como macrófagos são necessários para a proteção do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* (DUNAY et al., 2008), avaliamos a formação dos LDs nessas células em comparação com fibroblastos murinos. Os resultados dos nossos experimentos mostraram que os LDs se formam durante a infecção com a cepa RH ou ME-49 de *T. gondii*, como demonstrado pelo grande número de células hematopoiéticas ou não hematopoiéticas contendo LDs em comparação com as células não infectadas.

A utilização do estímulo com IFN- $\gamma$ , uma citocina importante para ativar os macrófagos a desenvolver sua resposta inflamatória, é necessária para eliminar o parasito intracelular (NATHAN et al., 1983; MARTINEZ, 2011). Observamos que IFN- $\gamma$  induz uma maior formação de LDs, principalmente em macrófagos J774.1, contudo níveis mais baixos foram detectados em macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos NIH/3T3, apesar de serem mais elevados quando comparados com as células não estimuladas. Macrófagos J774.1 e RAW 264.7 são derivados de camundongos BALB/c, no entanto, eles apresentam algumas

particularidades; as células RAW 264.7 não expressam TLR-5 e, portanto, não respondem ao estímulo com flagelina (MIZEL et al., 2003; WEST; DANCHO; MIZEL, 2005), apesar de não ter sido encontrada a molécula de flagelina em *Toxoplasma*.

Cepas de *T. gondii* apresentam virulências diferentes, macrófagos (célula necessária para a imunidade do hospedeiro contra *Toxoplasma*) quando infectados com a cepa tipo I ou tipo III são alternativamente ativados, enquanto que macrófagos infectados com a cepa tipo II são classicamente ativados (JENSEN et al., 2011). Em nossos resultados observamos que células RAW 264.7 não apresentam diferença na formação dos LDs quando infectados com a cepa RH ou ME-49, por outro lado, as células J774.1 apresentam uma indução mais elevada de formação dos LDs quando infectadas com a cepa ME-49 em comparação com a infecção com a cepa RH ou estímulo com IFN- $\gamma$ .

Estudos anteriores mostram que vários tipos de células podem formar LDs quando expostos a um agente patogênico ou derivados patogênicos (PACHECO et al., 2002; MOREIRA et al., 2009; BEILSTEIN et al., 2013). Embora as células J774.1 infectadas com a cepa ME-49 apresentaram formação de LDs mais elevada em comparação com a infecção com a cepa RH, e em células RAW 264.7 a infecção com a cepa RH ou ME-49 induziram a formação de LDs de forma semelhante, um grande número de células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) apresentaram LDs após a infecção com *T. gondii*. Além disso, nossos dados mostraram que os macrófagos J774.1 e fibroblastos NIH/3T3 apresentaram níveis mais elevados de formação de LDs quando infectados com a cepa ME-49 em comparação com os macrófagos RAW 264.7.

Estudos anteriores mostraram que macrófagos RAW 264.7 infectados com a cepa tipo II (Pru) produzem baixos níveis de atividade da arginase mensurado pela conversão de L-arginina em ureia, em contraste as células infectadas com cepa tipo I (RH) e tipo III (CEP) produzem baixos níveis de IL-23, IL-12p70 e níveis altos da atividade da arginase (JENSEN et al., 2011). Os diferentes níveis de células contendo LDs encontrado em nossos experimentos podem ser explicados pela divergência entre as cepas de *T. gondii* utilizada, como demonstrado no estudo de Jensen e colaboradores (2011).

A formação dos LDs está envolvida com a sinalização e reconhecimento de patógenos por receptores do tipo Toll (TLR) e estudos experimentais têm mostrado que a formação dos LDs em macrófagos induzida com LPS é dependente de TLR-4 (PACHECO et al., 2002). Além disso, leucócitos derivados de camundongos deficientes em TLR-2 não conseguem formar LDs quando infectados com *Mycobacterium bovis* (D'AVILA et al., 2006) e a formação dos LDs é diminuída quando ocorre o bloqueio com anti-TLR-3 em células de



Sertoli (WU et al., 2008). Assim a grande quantidade de LDs observados em nosso trabalho experimental pode ser devido a diferença de ativação dos TLRs entre diferentes tipos de células analisadas, uma vez que os macrófagos RAW 264.7 expressam TLR-2 e TLR-11, mas não expressam TLR-5, enquanto que os macrófagos J774.1 expressam TLR-2, mas não expressam TLR-11 (CAMPOPIANO, 2010; MATHUR et al., 2012). Além disso, o reconhecimento de *T. gondii* pelos TLRs é realizado por TLRs 2, 4, 9 e 11 (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003; YAROVINSKY et al., 2005; GAZZINELLI; DENKERS, 2006). Então, a formação dos LDs em células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) pode estar relacionada com a expressão de TLR, principalmente o TLR-2, e a ausência de TLR-11 parece não afetar a formação dos LDs, como observados nas células J774.1.

Estudos utilizando células não hematopoiéticas (NIH/3T3 e Swiss-3T3) demonstraram que essas células são capazes de formar LDs quando infectadas com adenovírus (IMAMURA et al., 2002). Em nosso trabalho verificamos que as células NIH/3T3 exibiram alta formação de LDs quando infectadas com a cepa RH ou ME-49.

LDs são sítio de geração de mediadores inflamatórios, como os eicosanoides (MELO, et al., 2011a) e contem ácido araquidônico em linhagens celulares a exemplo dos macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos. Além disso, a maior parte das enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico está associada com LDs, tais como ciclooxigenase, lipoxigenase e leucotrieno C<sub>4</sub> sintase (DVORÁK et al., 1994; BOZZA et al., 1997; BOZZA et al., 1998). A inibição da formação dos LDs utilizando drogas anti-inflamatórias não esteroidais tais como aspirina (inibidor da enzima ciclooxigenase – COX-1 e COX-2) tem sido utilizada em modelos experimentais de infecção com *Mycobacterium bovis* e *Trypanosoma cruzi* para avaliar o efeito dos LDs na interação parasito-hospedeiro (D'AVILA et al., 2006; D'AVILA et al., 2011). Em nossos experimentos, a aspirina foi eficaz em ambas as células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) e não hematopoiéticas (NIH/3T3) na inibição da formação dos LDs, independente a cepa de *T. gondii* utilizada, embora os fibroblastos mostraram uma tendência a serem mais suscetíveis a inibição pela aspirina do que os macrófagos.

A replicação do parasito *T. gondii* em seu vacúolo parasitóforo necessita de um aumento substancial na massa de membrana, de modo que estudos anteriores demonstraram que este parasito é seletivo em relação à aquisição e compartimentalização dos lipídios da célula hospedeira, sendo compartimentalizados em endomembrana no parasito, e em alguns casos, foram aparentemente integrados a membrana vacuolar, ressaltando a capacidade do parasito em desviar e usar recursos lipídicos a partir do hospedeiro, um processo que pode

contribuir com a biogênese da membrana do parasito (CHARRON; SIBLEY, 2002). De acordo com estudos anteriores, a origem dos lipídios da membrana de *T. gondii* pode ser a partir de três categorias: os lipídios são adquiridos a partir da célula hospedeira; os lipídios são sintetizados em grande quantidade pelo parasito independente dos lipídios da célula hospedeira e os lipídios são produzidos *de novo* pelo parasito, contudo a síntese não chega a satisfazer as necessidades do parasito (COPPENS, 2006). D'Ávila e colaboradores (2011) mostraram que a formação dos LDs está associada com o aumento da replicação de *T. cruzi*.

Em nosso modelo experimental observamos que a inibição da formação dos LDs após 24 horas de infecção por *T. gondii* induziu uma maior quantidade de células infectadas e um maior número de parasitos em células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) quando infectadas com a cepa RH ou ME-49. O efeito da inibição só foi observado na quantidade de parasitos na infecção pela cepa RH nos fibroblastos (NIH/3T3). O número de parasitos por célula não foi afetado em macrófagos J774.1 após a inibição com aspirina, contudo, os parasitos (RH e ME-49) multiplicaram-se mais em células RAW 264.7. Nos fibroblastos apenas a cepa RH teve sua taxa de multiplicação aumentada com o tratamento. Os dados sugerem que em macrófagos a formação de corpos lipídicos parece estar relacionada com o controle do parasito, entretanto, nos fibroblastos, esses corpos lipídicos parecem estar envolvidos com o fornecimento de lipídios para formação de membrana e crescimento do parasito.

Para verificar se a formação dos LDs está associada com o número de células infectadas, nós analisamos a influência e virulência da cepa tipo I ou tipo II do parasito, RH e ME-49, respectivamente, em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Não foi encontrada diferença no número de células infectadas comparada entre as cepas RH e ME-49 em células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3. Contudo, observamos que os fibroblastos NIH/3T3 apresentam uma tendência em serem mais infectadas quando comparadas com os macrófagos. No entanto, a baixa contagem de células infectadas nas linhagens celulares com o alto número de células formando LDs pode ser explicada pela formação indireta de LDs, como por exemplo, a partir da liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que são liberados no meio e ativam células vizinhas em condições inflamatórias (D'AVILA et al., 2007; D'AVILA; MAYA-MONTEIRO; BOZZA, 2008).

Várias proteínas estruturais estão associadas com a formação dos LDs, sendo a proteína ADRP a mais abundante em LDs em células do fígado e macrófagos, além de estar envolvida no transporte e armazenamento de lipídios neutros (ROBENEK et al., 2005; MAGRA et al., 2006; MASUDA et al., 2006). Estudos têm demonstrado que existe uma

associação entre a expressão da proteína ADRP e condições patológicas, tais como infecção por *Mycobacterium leprea* (TANIGAWA et al., 2008; DEGANG et al., 2012), progressão da aterosclerose (MOTOMURA et al., 2006) e esteatose hepática (NUOTIO et al., 2007; ). Nossos resultados mostraram que a infecção por *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP em ambas as células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Contudo, a cepa ME-49 mostrou uma maior capacidade em induzir a expressão da proteína ADRP e formação de LDs quando comparadas com a cepa RH, pelo menos nas células J774.1 e NIH/3T3.

A baixa expressão da proteína ADRP e a alta quantidade de células contendo LDs em células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3 infectada com a cepa RH pode ser explicado pela expressão de outras proteínas que estão envolvidas na formação dos LDs tais como perilipin, TIP 47 e S3-12 (BRASAEMLE, 2007).

Os resultados deste trabalho demonstram que a infecção por *T. gondii* induz uma alta formação de corpos lipídicos tanto em células hematopoiéticas quanto não hematopoiéticas e que tal formação é inibida pelo ácido acetilsalicílico (AAS) resultando em aumento do parasitismo, bem como multiplicação do parasito, sendo que este aumento é maior nas células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) do que nas não hematopoiéticas (NIH/3T3). Este dado sugere que a inibição da formação dos corpos lipídicos aumenta a virulência por *T. gondii*. Por outro lado, quando as células não são tratadas com AAS, os fibroblastos demonstraram maior suscetibilidade à infecção pelo parasito. Além disso, este trabalho indica que a expressão da proteína ADRP nas células RAW 264.7, J774.1 e NIH/3T3 é induzida pela infecção, porém, tal expressão é maior quando a infecção ocorre com a cepa ME-49 de *T. gondii*.

## 7. Conclusões

- A infecção por *T. gondii* induz a formação de corpos lipídicos em células hematopoiéticas (RAW 264.7 e J774.1) e não hematopoiéticas (NIH/3T3). Além disso, a cepa ME-49 é capaz de induzir altos níveis de formação de LDs em células hematopoiética (J774.1) e não hematopoiéticas (NIH/3T3) quando comparadas com a cepa RH.

- A formação dos corpos lipídicos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas foi inibida pelo ácido acetilsalicílico após 24 horas de tratamento ou 48 horas de infecção, sendo que houve diminuição na formação dos corpos lipídicos em todas as linhagens celulares infectadas com a cepa RH ou ME-49. Além disso, os fibroblastos mostraram uma tendência em formar menos corpos lipídicos quando tratados com AAS em comparação com os macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) na infecção pelas cepas RH ou ME-49 de *T. gondii*.

- Os fibroblastos demonstraram maior suscetibilidade à infecção por *T. gondii*, enquanto que os macrófagos RAW 264.7 e J774.1 apresentaram índices similares de infecção quando infectados com a cepa RH ou ME-49.

- A inibição da formação dos corpos lipídicos aumenta a virulência por *T. gondii*, uma vez que o tratamento com o ácido acetilsalicílico induziu um maior número de macrófagos RAW 264.7 e J774.1 infectados por ambas as cepas.

- A multiplicação dos parasitos foi maior nos macrófagos RAW 264.7 infectados com as cepas RH e ME-49 após o tratamento com AAS, sugerindo que a formação dos corpos lipídicos durante a infecção por *T. gondii* parece regular a multiplicação de parasitos em macrófagos.

- A infecção por *T. gondii* induz a expressão da proteína ADRP, envolvida com a formação de corpos lipídicos, em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. A expressão de proteína ADRP foi aumentada durante a infecção com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii* nos macrófagos, enquanto que nos fibroblastos este aumento foi verificado apenas pela infecção com a cepa RH.

- A infecção com a cepa ME-49 em macrófagos (RAW 264.7 e J774.1) e fibroblastos (NIH/3T3) induziu maior expressão da proteína ADRP comparada com as células infectadas com a cepa RH.

## 8. Referências Bibliográficas

- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of Infections Disease**. V. 186, n. 5, p. 684-689, 2002.
- ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**. V. 1, n. 2, p. e17, 2005.
- APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**. V. 30, n. 11, p. 1187-1191, 2000.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; AMARAL, F. A.; BOZZA, F. A.; FAGUNDES, C. T.; SOUSA, L. P.; SOUZA, D. G.; PACHECO, P.; BARBOSA-LIMA, G.; GOMES, R. N.; BOZZA, P. T.; DA POIAN, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; BOZZA, M. T. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. **FASEB Journal**. V. 24, n. 1, p. 218-228, 2010.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. V. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.
- BANDEIRA-MELO, C.; PHOOFOLO, M.; WELLER, P. F. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C<sub>4</sub> production in eosinophils and basophils. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 276, n. 25, p. 22779-22787, 2001.
- BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B.; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. **Journal of Lipid Research**. V. 48, n. 4, p. 837-847, 2007.

BELSTEIN, F.; BOUCHOUX, J.; ROUSSET, M.; DEMIGNOT, S. Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7 enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion.

**PLoS One**. V. 8, n. 1, p. e53017, 2013.

BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; NUSSENBLATT, R.; KHAN, A.; SIBLEY, L. D.; BELFORT, R. JR. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V. 79, n. 1, p. 111-114, 2007.

BENEVIDES, L.; MILANEZI, C. M.; YAMAUCHI, L. M.; BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; SILVA, N. M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **The American Journal of Pathology**. V. 173, n. 3, p. 741-751, 2008.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. V. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; DWYER, N. K.; BARBER, T.; COXEY, R. A.; TAKEDA, T.; RONDINONE, C. M.; THEODORAKIS, J. L.; GREENBERG, A. S.; LONDOS, C. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. **Journal of Lipid Research**. V. 36, n. 6, p. 1211-1226, 1995.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**. V. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews: Microbiology**. V. 6, n. 1, p. 79-88, 2008.

BOZZA, P. T.; YU, W.; PENROSE, J. F.; MORGAN, E. S.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 186, n. 6, p. 909-920, 1997.

BOZZA, P. T.; YU, W.; CASSARA, J.; WELLER, P. F. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **Journal of Leukocyte Biology**. V. 64, n. 4, p. 563-569, 1998.

BOZZA, P. T., D'AVILA, H., ALMEIDA, P. E., MAGALHÃES, K. G., MOLINARO, R., ALMEIDA, C. J., MAYA-MONTEIRO, C. M. Lipid droplets in host-pathogen interactions. **Journal of Clinical Lipidology**. V. 4, n. 6, p. 791-807, 2009.

BRADLEY, P. J.; WARD, C.; CHENG, S. J.; ALEXANDER, D. L.; COLLIER, S.; COOMBS, G. H.; DUNN, J. D.; FERGUSON, D. J.; SANDERSON, S. J.; WASTLING, J. M.; BOOTHROYD, J. C. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 280, n. 40, p. 34245-34258, 2005.

BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Currents Opinion Microbiology**. V. 10, n. 6, p. 582-587, 2007.

BRASAEMLE, D. L.; BARBER, T.; WOLINS, N. E.; SERRERO, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; LONDOS, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. **Journal of Lipid Research**. V. 38, n. 11, p. 2249-2263, 1997.

BRASAEMLE, D. L.; DOLIOS, G.; SHAPIRO, L.; WANG, R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biology Chemistry**. V. 279, n. 45, p. 46835-46842, 2004.

BRASAEMLE, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **Journal of Lipid Research**. V. 48, n. 12, p. 2547-2559, 2007.



BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infection and Immunity**. V. 70, n. 9, p. 5216-5224, 2002.

CAMPOPIANO, J. C. **Influência da ativação de macrófagos via receptores do tipo Toll (TLRs) na produção de fatores moduladores da sobrevivência de linfócitos T**. 39f. Dissertação (Mestrado) apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**. V. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.

CARRUTHERS, V. B. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal for Parasitology**. V. 36, n. 5, p. 595-600, 2006.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**. V. 10, n. 1, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophrenia Bulletin**. V. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**. V. 115, n. 15, p. 3049-3059, 2002.

CHAUDHARY, K.; DARLING, J. A.; FOHL, L. M.; SULLIVAN, W. J. JR.; DONALD, R. G.; PFEFFERKORN, E. R.; ULLMAN, B.; ROOS, D. S. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 279, n. 30, p. 31221-31227, 2004.

COPPENS, I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. **Cellular Microbiology**. V. 8, n. 1, p. 1-9, 2006.

COPPENS, I.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J. C.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**. V. 125, n. 2, p. 261-274, 2006.

D'AVILA, H.; MELO, R. C.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. **Journal of Immunology**. V. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

D'AVILA, H.; ALMEIDA, P. E.; ROQUE, N. R.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. **Infection and Immunity**. V. 75, n. 3, p. 1507-1511, 2007.

D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **International Immunopharmacology**. V. 8, n. 10, p. 1308-1315, 2008.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E<sub>2</sub> generation and increased parasite growth. **The Journal of Infectious diseases**. V. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**. V. 12, n. 2, p. 326-329, 2006.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; DUBREMETZ, J. F.; GEYER, H.; GEYER, R.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; SCHWARZ, R. T. Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$

production in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 278, n. 35, p. 32987-32993, 2003.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M. A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M. G.; MANSUR, D. S.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**. V. 179, n. 2, p. 1129-1137, 2007.

DEGANG, Y.; AKAMA, T.; HARA, T.; TANIGAWA, K.; ISHIDO, Y.; GIDOH, M.; MAKINO, M.; ISHII, N.; SUZUKI, K. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. **PLoS Neglected Tropical Disease**. V. 6, n. 12, p. e1936, 2012.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, D.; SHER, A. Emergence of NK1.1<sup>+</sup> cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 178, n. 5, p. 1465-1472, 1993.

DENKERS, E. Y.; YAP, G.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; BUTCHER, B. A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; SHER, A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**. V. 159, n. 4, p. 1903-1908, 1997.

DUBEY JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. V. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. V. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. V. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P. A.; MCFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E. B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**. V. 41, n. 11, p. 1139-1147, 2011.

DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular Microbiology**. V. 9, n. 4, p. 841-848, 2007.

DUMÈTRE, A.; DUBEY, J. P.; FERGUSON, D. J.; BONGRAND, P.; AZAS, N.; PUECH, P. H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**. V. 110, n. 28, p. 11535-11540, 2013.

DUNAY, I. R.; DAMATTA, R. A.; FUX, B.; PRESTI, R.; GRECO, S.; COLONNA, M.; SIBLEY, L. D. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**. V. 29, n 2, p. 306-317, 2008.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion of Immunology**. V. 22, n. 4, p. 461-466, 2010.

DVORAK, A. M.; WELLER, P. F.; HARVEY, V. S.; MORGAN, E. S.; DVORAK, H. F. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. **International Archives of Allergy and Immunology**. V. 101, n. 2, p. 136-142, 1993.

DVORÀK, A. M.; MORGAN, E. S.; TZIZIK, D. M.; WELLER, P. F. Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound

cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. **International Archives of Allergy and Immunology**. V. 105, n. 3, p. 245-250, 1994.

EL HAJJ, H.; LEBRUN, M.; AROLD, S. T.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J. F. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**. V. 3, n. 2, p. e14, 2007.

ERBE, D. V.; PFEFFERKORN, E. R.; FANGER, M W. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**. V. 146, n. 9, p. 3145-3151, 1991.

FEINGOLD, K. R.; KAZEMI, M. R.; MAGRA, A. L.; MCDONALD, C. M.; CHUI, L. G.; SHIGENAGA, J. K.; PATZEK, S. M.; CHAN, Z. W.; LONDOS, C.; GRUNFELD, C. ADRP/ADFP and Mal1 expression are increased in macrophages treated with TLR agonists. **Atherosclerosis**. V. 209, n. 1, p. 81-88, 2010.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**. V. 18, n. 8, p. 355-359, 2002.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**. V. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BIDERRE, C.; BRICHE, I.; LOYENS, A.; ODBERG-FERRAGUT, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 83, n. 2, p. 201-210, 1996.

FOX, B. A.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **International Journal for Parasitology**. V. 34, n. 3, p. 323-331, 2004.

FUJIMOTO, Y.; ITABE, H.; SAKAI, J.; MAKITA, M.; NODA, J.; MORI, M.; HIGASHI, Y.; KOJIMA, S.; TAKANO, T. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched

fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1644, n. 1, p. 47-59, 2004.

GAIL, M.; GROSS, U.; BOHNE, W. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. **Parasitology Research**. V. 94, n. 3, p. 233-239, 2004.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**. V. 90, n. 13, p. 6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**. V. 153, n. 6, p. 2533-2543, 1994.

GAZZINELLI, R. T.; BALA, S.; STEVENS, R.; BASELER, M.; WAHL, L.; KOVACS, J.; SHER, A. HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. **Journal of Immunology**. V. 155, n. 3, p. 1565-1574, 1995.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews. Immunology**. V. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Disease**. V. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.

HAJJ, H. E.; LEBRUN, M.; FOURMAUX, M. N.; VIAL, H.; DUBREMETZ, J. F. Characterization, biosynthesis and fate of ROP7, a ROP2 related rhoptry protein of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 146, n. 1, p. 98-100, 2006.

HAMMOUDA, N. A.; RASHWAN, E. A.; HUSSIEN, E. D.; ABO EL-NAGA, I.; FATHY, F. M. Measurement of respiratory burst of TNF and IL-1 cytokine activated murine peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. V. 25, n. 3, p. 683-691, 1995.

HÖLTTÄ-VUORI, M.; TANHUANPÄÄ, K.; MÖBIUS, W.; SOMERHARJU, P.; IKONEN, E. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. **Molecular Biology of Cell**. V. 13, n. 9, p. 3107-3122, 2002.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infections Disease**. V. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

HSIEH, K.; LEE, Y. K.; LONDOS, C.; RAAKA, B. M.; DALEN, K. T.; KIMMEL, A. R. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. **Journal of Cell Science**. V. 125, n. 17, p. 4067-4076, 2012.

HU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; FRAUNHOLZ, M.; SURAVAJJALA, S.; DILULLO, C.; YATES, J.; ROOS, D. S.; MURRAY, J. M. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**. V. 2, n. 2, p. e13, 2006.

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**. V. 62, n. 7, p. 2818-2824, 1994.

IMAMURA, M.; INOUCHI, T.; IKUYAMA, S.; TANIGUCHI, S.; KOBAYASHI, K.; NAKASHIMA, N.; NAWATA, H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**. V. 283, n. 4, p. 775-783, 2002.

JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**. V. 28, p. 55-105, 1989.

JACKSON, K. E.; KLONIS, N.; FERGUSON, D. J.; ADISA, A.; DOGOVSKI, C.; TILLEY, L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**. V. 54, n. 1, p. 109-122, 2004.

JENSEN, K. D.; WANG, Y.; WOJNO, E. D.; SHASTRI, A. J.; HU, K.; CORNEL, L.; BOEDEC, E.; ONG, Y. C.; CHIEN, Y. H.; HUNTER, C. A.; BOOTHROYD, J. C.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. **Cell Host & Microbe**. V. 9, n. 6, p. 472-483, 2011.

JIANG, H. P.; SERRERO, G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of the American**. V. 89, n. 17, p. 7856-7860, 1992.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. **Experimental Parasitology**. V. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. **Infection and Immunity**. V. 70, n. 1, p. 185-191, 2002.

KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **Journal of Immunology**. V. 164, n. 5, p. 2629-2634, 2000.

KARANIS, P.; ALDEYARBI, H. M. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. **International Journal for Parasitology**. V. 41, n. 12, p. 1231-1242, 2011.

KHAN, I. A.; THOMAS, S. Y.; MORETTO, M. M.; LEE, F. S.; ISLAM, S. A.; COMBE, C.; SCHWARTZMAN, J. D.; LUSTER, A. D. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS Pathogens**. V. 2, n. 6, p. e49, 2006.



- KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J. P.; DARDE, M. L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**. V. 104, n. 37, p. 14872-14877, 2007.
- KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal of Parasitology**. V. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.
- KIM, S. K.; FOUTS, A. E.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. **Journal of Immunology**. V. 178, n. 8, p. 5154-5165, 2007.
- KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma*: the next 100 years. **Microbes and Infection**. V. 10, n. 9, p. 978-984, 2008.
- KHOR, V. K.; SHEN, W. J.; KRAEMER, F. B. Lipid droplet metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. V. 16, n. 6, p. 632-637, 2013.
- KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**. V. 9, n. 3, p. 338-352, 2008.
- LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. V. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008.
- LANG, C.; ALGNER, M.; BEINERT, N.; GROSS, U.; LÜDER, C. G. Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. **Microbes and Infection**. V. 8, n. 8, p. 1994-2005, 2006.
- LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**. V. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.

- LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. **Parasitology Research**. V. 76, n. 7, p. 559-562, 1990.
- LIM, D.; GOLD, D. A.; JULIEN, L.; ROSOWSKI, E. E.; NIEDELMAN, W.; YAFFE, M. B.; SAEIJ, J. P. Structure of the *Toxoplasma gondii* ROP18 kinase domain reveals a second ligand binding pocket required for acute virulence. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 288, n. 48, p. 34968-34980, 2013.
- LINDSTRÖM, I.; SUNDAR, N.; LINDH, J.; KIRONDE, F.; KABASA, J. D.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P.; SMITH, J. E. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. **Parasitology**. V. 135, n. Pt 1, p. 39-45, 2008.
- LÜTJEN, S.; SOLTEK, S.; VIRNA, S.; DECKERT, M.; SCHLÜTER, D. Organ-and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. **Infection and Immunity**. V. 74, n. 10, p. 5790-5801, 2006.
- LYCKE, E.; CARLBERG, K.; NORRBY, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *toxoplasma*. **Infection and Immunity**. V. 11, n. 4, p. 853-861, 1975.
- MCLAUCHLAN, J. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1791, n. 6, p. 552-559, 2009.
- MAGRA, A. L.; MERTZ, P. S.; TORDAY, J. S.; LONDOS, C. Role of adipose differentiation-related protein in lung surfactant production: a reassessment. **Journal of Lipid Research**. V. 47, n. 11, p. 2367-2373, 2006.
- MAI, K.; SHARMAN, P. A.; WALKER, R. A.; KATRIB, M.; DE SOUZA, D.; MCCONVILLE, M. J.; WALLACH, M. G.; BELL, S. I.; FERGUSON, D. J.; SMITH, N. C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 104, n. 2, p. 281-289, 2009.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. V. 7, n. 5, p. 373-378, 2006.

MARTINEZ, F. O. Regulators of macrophage activation. **European Journal of Immunology**. V. 41, n. 6, p. 1531-1534, 2011.

MASUDA, Y.; ITABE, H.; ODAKI, M.; HAMA, K.; FUJIMOTO, Y.; MORI, M.; SASABE, N.; AOKI, J.; ARAI, H.; TAKANO, T. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. **Journal of Lipid Research**. V. 47, n. 1, p. 87-98, 2006.

MATHUR, R.; OH, H.; ZHANG, D.; PARK, S. G.; SEO, J.; KOBLANSKY, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. A mouse model of *Salmonella typhi* infection. **Cell**. V. 151, n. 3, p. 590-602, 2012.

MATTOS, K. A.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, V. G.; SARNO, E. N.; ATELLA, G. C.; PEREIRA, G. M.; BOZZA, P. T.; PESSOLANI, M. C. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**. V. 87, n. 3, p. 371-384, 2010.

MATTOS, K. A.; LARA, F. A.; OLIVEIRA, V. G.; RODRIGUES, L. S.; D'AVILA, H.; MELO, R. C.; MANSO, P. P.; SARNO, E. N.; BOZZA, P. T.; PESSOLANI, M. C. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**. V. 13, n. 2, p. 259-273, 2011.

MCDONALD, V.; SHIRLEY, M. W. Past and future: vaccination against *Eimeria*. **Parasitology**. V. 136, n. 12, p. 1477-1489, 2009.

MEISSNER, M.; REISS, M.; VIEBIG, N.; CARRUTHERS, V. B.; TOURSEL, C.; TOMAVO, S.; AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. **Journal of Cell Science**. V. 115, n. 3, p. 563-574, 2002.

MELO, R. C.; D'AVILA, H.; FABRINO, D. L.; ALMEIDA, P. E.; BOZZA, P. T.

Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue & Cell**. V. 35, n. 1, p. 59-67, 2003.

MELO, R. C.; SABBAN, A.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies: inflammation-related organelles are rapidly detected by wet scanning electron microscopy. **Journal of Lipid Research**. V. 47, n. 11, p. 2589-2594, 2006.

MELO, R. C.; D'AVILA, H.; WAN, H. C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. V. 59, n. 5, p. 540-556, 2011a.

MELO, R. C.; D'ÁVILA, H.; BOZZA, P. T.; WELLER, P. F. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. **Methods in Molecular Biology**. V. 689, n. 149-161, 2011b

MERCIER, C.; ADJOGBLE, K. D.; DÄUBENER, W.; DELAUW, M. F. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International Journal for Parasitology**. V. 35, n. 8, p. 829-849, 2005.

MIZEL, S. B.; HONKO, A. N.; MOORS, M. A.; SMITH, P. S.; WEST, A. P. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. **Journal of Immunology**. V. 170, n. 12, p. 6217-6223, 2003.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. V. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MOREIRA, L. S.; PIVA, B.; GENTILE, L. B.; MESQUITA-SANTOS, F. P.; D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C.; DIAZ, B. L. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-driven PGE<sub>2</sub> synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1791, n. 3, p. 156-165, 2009.

MOTOMURA, W.; INOUE, M.; OHTAKE, T.; TAKAHASHI, N.; NAGAMINE, M.; TANNO, S.; KOHGO, Y.; OKUMURA, T. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 340, n. 4, p. 1111-1118, 2006.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**. V. 240, n. 1, p. 269-285, 2011.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**. V. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

NAGAMUNE, K.; HICKS, L. M.; FUX, B.; BROSSIER, F.; CHINI, E. N.; SIBLEY, L. D. Absciscic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. **Nature**. V. 451, n. 7175, p. 207-210, 2008.

NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 158, n. 3, p. 670-689, 1983.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> ed. Atheneu, São Paulo, p. 147-156, 2005.

NISHIKAWA, Y.; QUITTNAT, F.; STEDMAN, T. T.; VOELKER, D. R.; CHOI, J. Y.; ZAHN, M.; YANG, M.; PYPAERT, M.; JOINER, K. A.; COPPENS, I. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. **Cellular Microbiology**. V. 7, n. 6, p. 849-867, 2005.

NUOTIO, K.; ISOVIITA, P. M.; SAKSI, J.; IJÄS, P.; PITKÄNIEMI, J.; SONNINEN, R.; SOINNE, L.; SAIMANEN, E.; SALONEN, O.; KOVANEN, P. T.; KASTE, M.; LINDSBERG, P. J. Adipophilin expression is increased in symptomatic carotid atherosclerosis: correlation with red blood cells and cholesterol crystals. **Stroke**. V. 38, n. 6, p. 1791-1798, 2007.

OLOFSSON, S. O.; BOSTRÖM, P.; ANDERSSON, L.; RUTBERG, M.; PERMAN, J.; BORÉN, J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1791, n. 6, p. 448-458, 2009.

PACHECO, P.; BOZZA, F. A.; GOMES, R. N.; BOZZA, M.; WELLER, P. F.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation *in vivo*: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **Journal of Immunology**. V. 169, n. 11, p. 6498-6506, 2002.

PACHECO, P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; GOMES, R. N.; BARBOSA-LIMA, G.; WERMELINGER, L. B.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; SILVA, A. R.; BOZZA, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B<sub>4</sub>-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. **Journal of Immunology**. V. 179, n. 12, p. 8500-8505, 2007.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**. V. 39, n. 12, p. 385-394, 2009.

PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.; TAKIYA, C. M.; CÔRTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; DOSREIS, G. A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes and Infection**. V. 11, n. 2, p. 181-190, 2009.

POUPEL, O.; BOLETI, H.; AXISA, S.; COUTURE-TOSI, E.; TARDIEUX, I. Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. **Molecular Biology of the Cell**. V. 11, n. 1, p. 355-368, 2000.

PRINZ, W. A. A bridge to understanding lipid droplet growth. **Developmental Cell**. V. 24, n. 4, p. 335-336, 2013.

REICHMANN, G.; WALKER, W.; VILLEGAS, E. N.; CRAIG, L.; CAI, G.; ALEXANDER, J.; HUNTER, C. A. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. **Infection and Immunity**. V. 68, n. 3, p. 1312-1328, 2000.

REY, L. **Parasitologia**. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 866p, 2001.

ROBBEN, P. M.; LAREGINA, M.; KUZIEL, W. A.; SIBLEY, L. D. Recruitment of Gr-1<sup>+</sup> monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 201, n. 11, p. 1761-1769, 2005.

ROBENEK, H.; ROBENEK, M. J.; BUERS, I.; LORKOWSKI, S.; HOFNAGEL, O.; TROYER, D.; SEVERS, N. J. Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 280, n. 28, p. 26330-26338, 2005.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; FINOL, H. J.; PULIDO-MÉNDEZ, M.; MÁRQUEZ, A.; ANDRADE, G.; GONZÁLEZ, N.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M. E.; PINTO, A. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. V. 30, n. 2, p. 299-307, 1998.

SAEIJ, J. P.; COLLIER, S.; BOYLE, J. P.; JEROME, M. E.; WHITE, M. W.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**. V. 445, n. 7125, p. 324-327, 2007.

SAKA, H. A.; VALDIVIA, R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. V. 28, p. 411-437, 2012.

SAOUROS, S.; EDWARDS-JONES, B.; REISS, M.; SAWMYNADEN, K.; COTA, E.; SIMPSON, P.; DOWSE, T. J.; JÄKLE, U.; RAMBOARINA, S.; SHIVARATTAN, T.; MATTHEWS, S.; SOLDATI-FAVRE, D. A novel galectin-like domain from *Toxoplasma*

*gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 280, n. 46, p. 38583-38591, 2005.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of Immunology**. V. 168, n. 12, p. 5997-6001, 2002.

SCHREIBER, R. D.; FELDMAN, H. A. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. **The Journal of Infections Disease**. V. 141, n. 3, p. 366-369, 1980.

SCHULTZ, C. J.; TORRES, E.; LONDOS, C.; TORDAY, J. S. Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type II cells. **American Journal Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**. V. 283, n. 2, p. 288-296, 2002.

SEABRA, S. H.; DAMATTA, R. A.; DE MELLO, F. G.; DE SOUZA, W. Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**. V. 90, n. 3, p. 455-460, 2004.

SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 99, n. 1, p. 13-17, 2004a.

SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**. V. 50, n. 1, p. 50-53, 2004b.

SHER, A.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**. V. 150, n. 9, p. 3982-3989, 1993.



SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. V. 359, n. 6390, p. 82-85, 1992.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**. V. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society of Lond. Series B, Biological Science**. V. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

SIBLEY, L. D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 21, n. 5, p. 592-598, 2010.

SINAI, A. P.; WEBSTER, P.; JOINER, K. A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. **Journal of Cell Science**. V. 110, n. 17, p. 2117-2128, 1997.

SINAI, A. P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Sub-cellular Biochemistry**. V. 47, p. 155-164, 2008.

SORGI, C. A.; SECATTO, A.; FONTANARI, C.; TURATO, W. M.; BELANGÉ, C.; DE MEDEIROS, A. I.; KASHIMA, S.; MARLEAU, S.; COVAS, D. T.; BOZZA, P. T.; FACCIOLI, L. H. *Histoplasma capsulatum* cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B<sub>4</sub> generation and role in HIV-1 infection. **Journal of Immunology**. V. 182, n. 7, p. 4025-4035, 2009.

STRAUB, K. W.; CHENG, S. J.; SOHN, C. S.; BRADLEY, P. J. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. **Cellular Microbiology**. V. 11, n. 4, p. 590-603, 2009.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**. V. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**. V. 240, n. 4851, p. 516-518, 1988.

TANIGAWA, K.; SUZUKI, K.; NAKAMURA, K.; AKAMA, T.; KAWASHIMA, A.; WU, H.; HAYASHI, M.; TAKAHASHI, S.; IKUYAMA, S.; ITO, T.; ISHII, N. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. **FEMS Microbiology Letters**. V. 289, n. 1, p. 72-79, 2008.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 277, n. 46, p. 44507-4412, 2002.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; BEATTY, W. L.; HAJJ, H. E.; JEROME, M.; BEHNKE, M. S.; WHITE, M.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**. V. 314, n. 5806, p. 1776-1780, 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. V. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

THAM, W. H.; HEALER, J.; COWMAN, A. F. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**. V. 28, n. 1, p. 23-30, 2012.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; EL BOUHDIDI, A.; VAN BEECK, K.; CARLIER, Y.; DUBREMETZ, J. F.; VERSCHUEREN, H. Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. **Parasite Immunology**. V. 21, n. 11, p. 555-563, 1999.

WAN, H. C.; MELO, R. C.; JIN, Z.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **FASEB Journal**. V. 21, n. 1, p. 167-178, 2007.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations.

**International Journal for Parasitology**. V. 39, n. 8, p. 895-901, 2009.

WEST, A. P.; DANCHO, B. A.; MIZEL, S. B. Gangliosides inhibit flagellin signaling in the absence of an effect on flagellin binding to toll-like receptor 5. **The Journal of Biology Chemistry**. V. 280, n. 10, p. 9482-9488, 2005.

WOLINS, N. E.; SKINNER, J. R.; SCHOENFISH, M. J.; TZEKOV, A.; BENSCH, K. G.; BICKEL, P. E. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. **The Journal of Biology Chemistry**. V. 278, n. 39, p. 37713-37721, 2003.

WOLINS, N. E.; BRASAEMLE, D. L.; BICKEL, P. E. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. **FEBS Letters**. V. 580, n. 23, p. 5484-5491, 2006.

WU, H.; WANG, H.; XIONG, W.; CHEN, S.; TANG, H.; HAN, D. Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. **Endocrinology**. V. 149, n. 9, p. 4402-4412, 2008.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**. V. 308, n. 5728, p. 1626-1629, 2005.

YU, W.; BOZZA, P. T.; TZIZIK, D. M.; GRAY, J. P.; CASSARA, J.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. **The American Journal of Pathology**. V. 152, n. 3, p. 759-769, 1998.