

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Cepas TgChBrUD2 e ME49 de *Toxoplasma gondii* induzem polarização de macrófagos humanos para o perfil M1

PAULA SUELLEN GUIMARÃES GOIS

UBERLÂNDIA

Abril - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Cepas TgChBrUD2 e ME49 de *Toxoplasma gondii* induzem polarização de macrófagos humanos para o perfil M1

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

PAULA SUELLEN GUIMARÃES GOIS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloisa Amália Vieira Ferro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Bellisa de Freiras Barbosa

UBERLÂNDIA
Abril – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G616c Gois, Paula Suellen Guimarães, 1989
2016 Cepas TgChBrUD2 e ME49 de *Toxoplasma gondii* induzem polarização de macrófagos humanos para o perfil M1 / Paula Suellen Guimarães Gois. - 2016.

76 p. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Coorientadora: Bellisa de Freiras Barbosa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Macrófagos - Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Barbosa, Bellisa de Freiras, 1983-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Lúcia Guimarães Gois. Pessoa que amo muito e essencial na minha vida. Obrigada pelo carinho, compreensão, cuidado e confiança. Tudo o que sou hoje devo a você.

Ao meu pai Paulo Dantas de Gois e ao meu irmão Fernando Guimarães Gois que mesmo morando junto com Deus estão sempre presentes no meu coração.

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor.”

(Madre Teresa de Calcutá)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos, por me iluminar e me dar forças para seguir em frente.

À Nossa Senhora, minha mãe, que sempre intercedeu a Deus por mim.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Eloísa Amália Vieira Ferro por me aceitar e me tornar membro do seu laboratório. Você é um grande exemplo de profissional para mim. Obrigada pela confiança, apoio e, principalmente, pela compreensão nos momentos que mais precisei... serei eternamente grata por isso.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Bellisa de Freitas Barbosa pelas correções, sugestões e dedicação ao meu trabalho. Sua inteligência me ajudou muito!

À Prof^a. Dr^a. Priscila Silva Franco pela disposição e dedicação em me ajudar a aprender todos os protocolos da minha pesquisa. Sua ajuda foi fundamental. Não teria conseguido fazer nada se não fosse você. Acho que palavras não conseguem expressar a minha imensa gratidão. Muito obrigada!

À Pâmela Mendonça Guirelli pela ajuda na execução do meu projeto, pelas dicas, conselhos e por compartilhar comigo seus conhecimentos.

À Prof^a. Dr^a. Angélica de Oliveira Gomes pela amizade, ajuda e pelo apoio nos momentos difíceis. Suas palavras e incentivo me deram forças para seguir em frente.

Ao pessoal do laboratório Lara, Camilla, Andressa, Ariane, Francesca, Matheus, Juliana, Rafaela, Fernanda, Iliana e Ana Carolina pelos favores sempre concedidos. Ao Deivid e à Thádia que me ajudaram muito na execução do meu projeto.

Às secretárias da pós-graduação, Luceleide e Lucélia, pela ajuda e atenção que dedicaram a mim.

À Prof^a. Dr^a. Gabriela Lícia Santos Ferreira, minha mãe de faculdade e orientadora eterna, pelo carinho e amizade.

À minha família: vovô, madrinha, tios e tias, primos e primas, obrigada por serem para mim um berço de união e força. Obrigada por torcerem por mim. Amo vocês.

Às minhas amigas Talita, Joice, Daniela, Jenniffer, Patrícia e Aline Balioni pela amizade, apoio e força que vocês sempre me deram.

Ao CPNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : morfologia, estágios infectantes e ciclo biológico.....	11
1.2. Cepas de <i>T. gondii</i> e diversidade genética.....	14
1.3. Toxoplasmose	18
1.4. Resposta imune a <i>T. gondii</i>	20
1.5. Resposta imunológica de macrófagos mediante infecção por <i>T. gondii</i>	23
1.6. Monócitos da linhagem THP-1.....	26
JUSTIFICATIVA	27
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. METODOLOGIA	28
3.1. Manutenção das células THP-1 e BeWo em cultura	28
3.2. Manutenção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> das cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de <i>T. gondii</i> ...	29
3.3. Diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos	29
3.4. Infecção de macrófagos pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de <i>T. gondii</i>	30
3.5. Dosagem de citocinas por ELISA.....	31
3.6. Dosagem de nitrito.....	31
3.7. Mensuração da atividade de arginase em macrófagos.....	32
3.8. Análise morfológica de macrófagos não infectados e infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49	32
3.9. Análise da proliferação intracelular por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	33
3.10. Análise da polarização através da expressão de CD64, CD163, CD206 em macrófagos por citometria de fluxo	33
3.11. Análise estatística	34

4. RESULTADOS.....	34
4.1. Cepa atípica e clonais de <i>T. gondii</i> provocam aumento da produção de MIF e diminuição de IL-10 nos macrófagos, e TgChBrUD2 induz o aumento de IL-6	34
4.2. Os macrófagos infectados pela cepa atípica aumenta a liberação de nitrito e a infecção por ME49 e TgChBrUD2 induz a redução da secreção de ureia nos macrófagos.....	35
4.3. A proliferação de <i>T. gondii</i> é maior nos macrófagos infectados por RH.....	35
4.4. Macrófagos infectados com TgChBrUD2 apresentaram predomínio da morfologia fusiforme.....	36
4.5. A infecção pelas cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 induz expressão semelhante de marcadores de superfície em macrófagos humanos.....	36
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	44
7. FIGURAS.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO.....	75

RESUMO

Vários mecanismos imunológicos são responsáveis pelo controle da infecção por *Toxoplasma gondii*. A resposta imune a este patógeno ocorre inicialmente pela participação de células da imunidade inata, na qual macrófagos têm papel importante. A existência de cepas atípicas de *T. gondii* com padrão genético diferente das clonais desperta grande preocupação mundial, uma vez que, geralmente, causam sintomas graves particularmente em indivíduos imunocomprometidos e naqueles infectados congenitamente. O objetivo deste estudo foi comparar, *in vitro*, a polarização de macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 para um perfil M1 ou M2 após infecção com as cepas clonais RH, ME49 e a cepa atípica TgChBrUD2. Células THP-1 foram tratadas com PMA para induzir sua diferenciação em macrófagos funcionais. Após a diferenciação, esses macrófagos foram plaqueados e infectados com as cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 de *T. gondii* em diferentes abordagens experimentais. Como controle foram utilizados macrófagos não infectados. Os sobrenadantes de cultura de macrófagos nas diferentes condições experimentais foram coletados para análise de citocinas pelo teste ELISA e dosagem de nitrito pela reação de Griess. As células foram utilizadas para avaliação da morfologia, quantificação da ureia por espectrofotometria, dos marcadores expressos na superfície celular por citometria de fluxo e do parasitismo por PCR. Nossos resultados mostraram um aumento das citocinas MIF durante infecção pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49, bem como uma diminuição de IL-10 quando comparado aos macrófagos não infectados. Além disso, macrófagos infectados pela cepa atípica apresentaram altos níveis de secreção de IL-6 em relação ao controle. Em relação a produção de nitrito, apenas os macrófagos infectados por TgChBrUD2 apresentaram aumento em relação aos macrófagos controle e aos infectados por RH. A dosagem de ureia revelou uma redução da atividade de arginase na infecção por TgChBrUD2 e ME49 comparado aos macrófagos não infectados. A análise da morfologia celular mostrou que a infecção por TgChBrUD2 induziu os macrófagos a mudarem seu formato de circulares para fusiformes. Por outro lado, a análise de PCR mostrou que a cepa RH proliferou significativamente mais nos macrófagos em comparação com as cepas TgChBrUD2 e ME49. Desse modo, nossos resultados mostraram que a cepa RH induziu resposta pró-inflamatória insuficiente que influenciou na proliferação do parasito, por outro lado, TgChBrUD2 e ME49 induziram fatores característicos da polarização para macrófagos M1, de modo que a cepa atípica mostrou maior liberação de mediadores pró-inflamatórios que auxiliaram a conter a replicação desta cepa.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, cepas brasileira, cepas clonais, polarização de macrófagos.

ABSTRACT

Several immunological mechanisms are responsible for the control of *Toxoplasma gondii* infection. The immune response occurs initially because of the participation of innate immune cells, in which macrophages play an important role. The existence of atypical strains of *T. gondii* with a genetic pattern different from clonal strains lead concern worldwide, principally because these strains cause severe symptoms especially in immunocompromised individuals and congenitally infected newborn. In this sense, we investigated the *in vitro* polarization of human macrophages to M1 or M2 profile after the infection with RH, ME49 clonal strains and TgChBrUD2 Brazilian strain. THP-1 cells were treated with PMA to induce their differentiation into macrophages. The cells were plated and infected with *T. gondii* tachyzoites from TgChBrUD2, RH or ME49 strains at a 2:1 (parasites: host cell) ratio or incubated only with medium (control – uninfected cells). The supernatant was collected for cytokine analysis and measurement of nitrite. The macrophages were used for quantification of urea, evaluation of parasitism, analysis of morphology and surface markers. Our results showed an up-regulation of MIF during infection by TgChBrUD2, RH and ME49, and low levels of IL-10 compared to control. In addition, TgChBrUD2-infected macrophages show high levels of IL-6 production compared to non-infected macrophages and RH infection. Regarding secretion of nitrite, the infection by TgChBrUD2 exhibited high levels of nitrite compared to control and RH infection. The urea production showed a down-regulation in macrophages infected with TgChBrUD2 and ME49 in comparison to control. The analysis of morphology revealed that TgChBrUD2-infected macrophages induced the cells to change their morphology to spindle shaped. On the other hand, PCR analysis showed an increased amount of *T. gondii* DNA in RH-infected macrophages compared to infection with TgChBrUD2 and ME49. Thus, our results showed that RH strain produced an insufficient pro-inflammatory response that influenced the proliferation of parasite, in contrast, TgChBrUD2 and ME49 induced characteristic factors of polarization to M1 macrophages, in which the atypical strain showed high production of pro-inflammatory mediators that helped to contain the replication of this strain.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Brazilian strain; clonal strains; macrophages polarization.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: morfologia, estágios infectantes e ciclo biológico

O protozoário parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* pertence ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidia e família Sarcocystidae (REY, 2001). No ano de 1908, este parasito foi descrito simultaneamente por Nicole e Manceaux no Norte da África em roedores (*Ctenodactylus gundi*) e no Brasil por Splendore em coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) (REY, 2001; KAWAZOE, 2005; DUBEY et al., 2012). *T. gondii* tem como hospedeiro definitivo os felídeos domésticos e selvagens, e uma gama de hospedeiros intermediários como vertebrados de sangue quente, incluindo a espécie humana (HUNTER; SIBLEY, 2012; ROBERT-GANGNEAUX, 2014).

O parasito geralmente exibe forma alongada e arqueada, mas pode também apresentar um aspecto ovalado, indicando o início de um novo processo de divisão celular (SOUZA et al., 2010). *T. gondii* possui um núcleo central ou mais próximo de sua extremidade posterior. Na região anterior encontra-se o complexo apical, caracterizado por uma prega na membrana plasmática demarcando uma depressão central, e logo abaixo dessa região, localiza-se uma organela denominada conoide. Estas estruturas são importantes na manutenção da forma do parasito e também estão envolvidas com a motilidade e direcionamento de vesículas secretórias que auxiliam o mecanismo de invasão (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HU et al., 2006; DUPONT et al., 2012). Organelas secretórias associadas ao complexo apical, como: roptrias, micronemas e grânulos densos são responsáveis por secretar fatores químicos relacionados com a adesão e invasão do parasito à célula hospedeira e à formação do vacúolo parasitóforo (KAWAZOE, 2005; CARRUTHERS, 2006; BLADER; SAEIJ, 2009; SHEINER et al., 2010; PENG et al., 2011). A adesão de *T. gondii* à célula hospedeira é inicialmente mediada por proteínas de superfície do parasito, denominadas comumente de antígenos de superfície (SAGs) (POLLARD et al., 2008). Após esse primeiro contato com a célula hospedeira, o parasito aumenta seus níveis intracelulares de cálcio, o que permite ativar várias quinases dependentes de cálcio que, por sua vez, induzem a secreção de proteínas derivadas das micronemas (ZHOU et al., 2005; NAGAMUNE; SIBLEY, 2006; BLADER; SAEIJ, 2009).

Até o momento foram descritos 20 tipos de proteínas secretadas pelas micronemas (MIC) (ZHOU et al., 2005; BLADER; SAEIJ, 2009). Barragan e colaboradores (2005) demonstraram que a micronema MIC-2 de *T. gondii* se liga à molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1) da célula hospedeira, permitindo ao parasito invadir os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta, utilizando-se de uma via paracelular. Esse tipo de deslocamento parasitário permite a invasão de novos tecidos e, conseqüentemente, a disseminação mais rápida do parasito no organismo hospedeiro. Após a adesão de *T. gondii* na célula hospedeira, o parasito inicia um movimento específico e dependente de actina e miosina denominado *gliding* (BLADER; SAEIJ, 2009). Em seguida, ocorre a liberação de proteínas derivadas das roptrias (ROPs), onde várias subunidades de ROP-2, ROP-4, ROP-5 e ROP-8 associam-se para formar um complexo capaz de transportar o parasito para o interior da célula hospedeira (STRAUB et al., 2009).

As ROPs e os grânulos densos (GRA) secretam proteínas polimórficas nas células hospedeiras que as tornam um ambiente propício ao crescimento do parasito por meio da modulação de uma variedade de processos no hospedeiro (BLADER; SAEIJ, 2009). Dentre as proteínas liberadas pelas ROPs, a ROP-16, encontrada no núcleo do parasito, é capaz de suprimir a resposta de macrófagos infectados através da inibição da atividade de fatores transcricionais prejudicando a resposta pró-inflamatória (SAEIJ et al., 2007; JENSEN et al., 2011; ROSOWSKI et al., 2011). Além disso, a GRA15, uma das proteínas liberada pelos grânulos densos, ativa genes de transcrição envolvidos na resposta anti-inflamatória (ROSOWSKI et al., 2011).

Os três estágios infectantes de *T. gondii* são os taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Durante a fase aguda da toxoplasmose são frequentemente encontradas as formas taquizoítas. Esse estágio infectante é capaz de invadir muitos tipos celulares e possui capacidade de multiplicação rápida, permitindo o aumento acelerado do número de parasitos e, conseqüentemente, uma veloz disseminação pelo sistema circulatório. Em razão disso, há elevada possibilidade de infectar vários tecidos e órgãos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; HUNTER; SIBLEY, 2012). A rápida disseminação do parasito também está ligada à sua capacidade de infectar células migratórias do sistema imune como monócitos, linfócitos e células dendríticas (SIBLEY, 2011). Por meio destas células, *T. gondii* se dispersa por vários tecidos e atravessa barreiras biológicas como a barreira placentária, hematoencefálica e a hematorretiniana (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; UNNO et al., 2008).

A fase crônica da infecção é representada pelos bradizoítas que são as formas de replicação lenta do parasito. Nessa fase, os bradizoítas encontram-se dentro de cistos teciduais. Cistos contendo bradizoítas são distribuídos pelos tecidos do hospedeiro, sendo mais frequentes nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÈ, 2012). Não havendo distúrbios no sistema imunológico, esta fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (ELSHEIKHA, 2008).

Já os esporozoítas estão localizados no interior de oocistos, que sofrem esporulação no meio ambiente ao serem liberados, juntamente com fezes de gatos, tornando-se então infectantes. Essa forma infectante é oriunda do processo de reprodução sexuada do parasito e são encontradas no meio ambiente, podendo contaminar água, solos e alimentos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Os oocistos são uma importante via de infecção da toxoplasmose, sendo que um único oocisto é capaz de provocar infecção em qualquer hospedeiro intermediário (TORREY; YOLKEN, 2013).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxeno facultativo e foi descrito em 1970. Os hospedeiros definitivos são felídeos dos gêneros *Felix* e *Lynx* e os hospedeiros intermediários incluem animais de sangue quente, como aves e a espécie humana (SILVA; LANGONI, 2009). Os felídeos podem se infectar com qualquer um dos estágios infectantes do parasito (DABRITZ; CONRAD, 2010; SHLUTER et al., 2014). Assim, inicia-se o desenvolvimento de múltiplas gerações de ciclos sexuada e assexuada de *T. gondii*. Nas células epiteliais do intestino, o parasito se replica, por um processo conhecido por esquizogonia, originando esquizontes. Os núcleos dos esquizontes iniciam lentamente a sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando merozoítos. Estes originam os macrogametas e microgametas (gametogonia), que ao se unirem formarão o zigoto que dará origem aos oocistos completando o ciclo sexuada. Os oocistos imaturos são liberados nas fezes dos felídeos e, no meio ambiente em condições propícias (temperatura, umidade e oxigenação ideiais) sofrem esporulação e se tornam infectantes. Cada oocisto esporulado de *T. gondii* possui, em seu interior, dois esporocistos, cada um contendo quatro células haploides denominadas esporozoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX, 2014). Os oocistos maduros sobrevivem por meses ou até anos, desde que não sejam expostos à luz solar direta e umidade relativa do ar muito baixa (HILL; DUBEY, 2002; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TORREY; YOLKEN, 2013). Os hospedeiros intermediários podem

adquirir a infecção por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, ingestão de água ou frutas e verduras contaminadas por oocistos, ingestão de taquizoítas em líquidos orgânicos como leite e saliva; por meio da transfusão sanguínea, transplante de órgãos e até mesmo por acidentes laboratoriais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; BLADER; SAEIJ, 2009; JONES; DUBEY, 2012; HILL; DUBEY, 2013; SCHLUTER et al., 2014) (Figura 1). Outra importante forma de transmissão por *T. gondii* ocorre pela via transplacentária, nesta os taquizoítas são capazes de atravessar a barreira placentária e promover a transmissão vertical do parasito para os tecidos embrionários ou fetais. A transmissão para o feto está relacionada com a ocorrência de abortamentos, natimortos, mortalidade neonatal, tanto no homem como em outros animais (KODJIKIAN, 2010; LINDSAY; DUBEY, 2011; CHAUDHIRY; GAD; KOREN, 2014).

1.2. Cepas de *T. gondii* e diversidade genética

Recentemente, os avanços em técnicas moleculares facilitaram a detecção, diagnóstico e genotipagem de *T. gondii* e permitiram, inclusive, a descoberta da ampla diversidade genética do parasito (DUBEY et al., 2008; MINOT et al., 2012; SU et al., 2012; ROBERT-GANGNEAUX, 2014; SHWAB et al., 2014).

As cepas de *T. gondii* encontradas principalmente na Europa e América do Norte apresentam um padrão genético clonal e pertencem a uma das três linhagens designadas como tipo I, II e III, segundo análises moleculares (HOWE; SIBLEY, 1995; SU et al., 2012; SHWAB et al., 2014). Estas cepas denominadas clonais são muito semelhantes do ponto de vista genético, sendo que a diferença gênica entre elas é menor ou igual a 1% (MORDUE et al., 2001; SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Para explicar a estrutura clonal das cepas de *T. gondii* os pesquisadores se basearam em várias hipóteses. Primeiramente, pode considerar-se a capacidade de transmissão do parasito entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo e sofrer meiose e recombinação sexual (SU et al., 2003). Além disso, pode se basear também no fato de haver macrogametas do parasito que permanecem infertilizados, e, através da partenogênese, formar oocistos no intestino dos felídeos (FERGUSON, 2002). Finalmente, outra possibilidade é a a infecção simultânea nos hospedeiros definitivos com diferentes tipos de cepas. Considerando ainda que felídeos

infectados simultaneamente, com diferentes cepas de *T. gondii*, poderiam permitir a recombinação genética dessas cepas. Entretanto, é um evento raro de ocorrer na natureza, levando em conta que os felídeos deveriam se alimentar de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerir duas presas, cada uma com uma cepa diferente em um curto intervalo de tempo. E, pelo fato dos gametas de *T. gondii* ser haploide contribui para a estrutura clonal, pois o hospedeiro definitivo infectado com apenas um tipo de cepa produz oocistos contendo esporozoítos geneticamente idênticos à amostra infectante original (AJZENBERG et al., 2004). A análise da virulência das cepas de *T. gondii* revela que a mesma é bem caracterizada em modelos murinos. Algumas espécies de roedores são parcialmente susceptíveis, e outras sucumbem à infecção, sendo que o gênero também pode influenciar na evolução da doença (HOWE; SIBLEY, 1995; ROBERTS; CRUICKSHANK; ALEXANDER, 1995; FAVORETO-JUNIOR et al., 1998). Os principais critérios para a determinação do grau de virulência de uma cepa baseiam-se na taxa de mortalidade e no tempo de mortalidade de camundongos infectados com inóculos crescentes de parasitos (KAUFMAN; REMINGTON; JACOBS, 1958). A partir da análise desses parâmetros, as cepas de *T. gondii* são definidas como virulentas, não virulentas ou de virulência intermediária (HOWE; SIBLEY, 1995).

As cepas do tipo I como RH, CAST e VEL são consideradas muito virulentas, causam uma rápida mortalidade em camundongos (HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG, 2002) e estão associadas a doenças oculares graves (VALLOCHI et al., 2005; COMMODARO et al., 2009). As cepas do tipo II, como ME49 e M3, são de moderada e baixa virulência, predominantes em isolados de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV) ou encefalite toxoplásmica e geralmente se relacionam a casos de reativação de infecção crônica em humanos e infecções congênicas (AJZENBERG et al., 2002; SIBLEY et al., 2009). Cepas do tipo III, como VEG e M-7741, são avirulentas, associam-se a infecções animais, e são responsáveis por infecções brandas e assintomáticas (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY et al., 2009).

A cepa RH foi isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (KHAN et al., 2009), sendo utilizada como padrão na comparação entre cepas e considerada altamente virulenta. Esta cepa é letal com uma dose mínima de taquizoítas em camundongos (DUBEY et al., 1999; DARDÉ, 2008). A cepa ME49 foi isolada da musculatura de carneiro em 1965 e é cistogênica ou de baixa virulência (SUZUKI et al., 1988). Certas linhagens de camundongos são mais susceptíveis que outras à infecção pela

ME49, levando a variações da patogenicidade. Tal cepa pode desenvolver meningoencefalite progressiva com alta taxa de mortalidade após doze semanas de infecção em camundongos C57BL/6. Por outro lado, em camundongos BALB/c e em roedores *Calomys callosus* é possível encontrar cistos no cérebro, o que caracteriza a fase crônica da infecção (GAZZINELLI et al., 1993; FERRO et al., 2002). Recentemente, foi descrito um novo tipo de cepa clonal, denominada cepa X e também conhecida como tipo 12. É predominante na América do Norte e encontrada em animais silvestres. Em camundongos, esta cepa registrou altos níveis de virulência (DUBEY et al., 2011; KHAN et al., 2011).

Nos últimos anos, estudos sobre os polimorfismos genéticos e caracterização genotípica em diferentes isolados de *T. gondii* originados tanto de material humano quanto animal, demonstraram a existência de diversidade genética do parasito (DUBEY et al., 2006b; PENA et al., 2008; KHAN et al., 2011; DUBEY et al., 2012; SHWAB et al., 2014). Tais isolados de *T. gondii* apresentam um padrão genético diferente (polimorfismos em nucleotídeos únicos) das cepas clonais existentes na América do Norte e Europa (MELO et al., 2013). Esses isolados, oriundos de diferentes países, quando analisados, demonstraram alta porcentagem de polimorfismo, sugerindo que a população de *T. gondii* é altamente diversa (PENA et al., 2008; MINOT et al., 2012; SU et al., 2012). Após caracterização e análise da virulência em camundongos, os isolados de *T. gondii* passam a ser denominados de cepas atípicas (MELO et al., 2013).

Pesquisas atuais apontam a existência de vários tipos de cepas atípicas. O estudo de Dubey e colaboradores (2006b) com isolados atípicos de *T. gondii* da Costa Rica revelou que dentre 11 cepas, quatro possuíam alelos tipo I e os sete restantes o alelo tipo III ou alelos combinantes (I e II, ou I e III), sendo que o tipo I é virulento para camundongos. Além disso, outros estudos com isolados de *T. gondii* chineses mostraram a existência de duas cepas geneticamente distintas TgCtwh3 e TgCtwh6 que se assemelham às três linhagens de *T. gondii* tipo I, II e III, sendo TgCtwh3 de alta virulência e TgCtwh6 de baixa virulência (LIU, et al., 2013).

A América do Sul é caracterizada por uma diversidade de genótipos de *T. gondii* (SU et al., 2012), encontrados em grande proporção no Brasil (DUBEY et al., 2006a; DARDÉ, 2008; DUBEY; SU, 2009; KHAN et al., 2009). Assim, observa-se que a população de *T. gondii* é altamente diversificada no Brasil, com alguns genótipos clonais circulantes em hospedeiros. Quatro genótipos identificados como BrI, BrII, BrIII e BrIV foram considerados clonais no Brasil. A análise da virulência em camundongos infectados evidenciou que o tipo

BrI é altamente virulento, os tipos BrII e BrIV revelaram virulência intermediária e o tipo BrIII foi considerado avirulento (PENA et al., 2008).

As cepas atípicas de *T. gondii* estão presentes em países do mundo inteiro, sendo responsáveis por diferentes sintomas clínicos, inclusive alguns que são mais graves em pessoas imunossuprimidas (DUBEY, 2006b; SU et al., 2012; LIU et al., 2013; STAJNER et al., 2013; LOPES et al., 2016). A alta diversidade genética das cepas de *Toxoplasma* na zona tropical das Américas pode explicar, parcialmente, porque a toxoplasmose congênita é mais sintomática na América do Sul do que na Europa, como foi demonstrado em coortes de crianças congenitamente infectadas de diferentes continentes (THIEBAUT et al., 2007; SAUER et al., 2011; MCLEOD et al., 2012). Uma pesquisa com crianças infectadas congenitamente no Brasil e na Europa revelou que as crianças brasileiras exibiram lesões oculares maiores e mais numerosas (GILBERT et al., 2008).

Em um estudo realizado em Uberlândia, no estado de Minas Gerais, foram encontradas duas cepas em amostras provenientes de corações de galinhas, denominadas TgChBrUD1 e TgChBrUD2. A genotipagem desses isolados mostrou que TgChBrUD1 pertence ao tipo BrII (genótipo #11 no ToxoDB PCR-RFLP), enquanto que TgChBrUD2 pertence ao tipo BrI (genótipo #6 no ToxoDB PCR-RFLP) (LOPES et al., 2016). Tais cepas atípicas são o resultado de recombinações genéticas das três linhagens clonais de *T. gondii*, além de apresentarem alelos não comuns às cepas clonais do parasito. Desse modo, TgChBrUD1 apresenta cinco marcadores genéticos da cepa tipo I, dois da tipo II e cinco da tipo III, já TgChBrUD2 possui nove marcadores do tipo I, um do tipo II e um do tipo III, além de um alelo atípico daqueles encontrados nos tipo I, II e III do parasito, denominado c22-8 (LOPES et al., 2016).

As duas cepas (TgChBrUD1 e TgChBrUD2) são capazes de provocar diferenças na infecção e tempo de rompimento das células, pois TgChBrUD1 expressa multiplicação lenta em relação a TgChBrUD2, sendo esta última capaz de romper todas as células infectadas. Em relação ao comportamento biológico, nota-se que ocorre formação de cistos e pouca quantidade de taquizoítas livres no exsudato peritoneal de camundongos na presença da cepa TgChBrUD1. Já TgChBrUD2 possui comportamento semelhante a cepa RH, provocando maior quantidade de taquizoítas no exsudato peritoneal (LOPES et al., 2016). Estudo recente de nosso grupo de pesquisa demonstrou o grau de susceptibilidade de *Calomys callosus* às cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 de *T. gondii*, revelando ser a cepa TgChBrUD2 mostrou-se mais virulenta do que a cepa TgChBrUD1 (FRANCO et al., 2014).

Células trofoblásticas da linhagem BeWo infectadas com estas cepas atípicas são mais susceptíveis a infecção por TgChBrUD2 do que quando infectadas com as cepas RH e ME49. Além disso, o tratamento com azitromicina é mais eficiente em controlar a infecção e replicação das cepas brasileiras do que os tratamentos convencionais utilizados (RIBEIRO, 2013). A gravidez pode ser responsável pela reativação da infecção crônica ou a reinfeção pode promover a transmissão vertical de *T. gondii*. Resultados experimentais revelaram que fêmeas prenhas de *C. callosus* cronicamente infectadas com ME49, e reinfectadas com TgChBrUD1, TgChBrUD2 apresentaram transmissão vertical por ambas as cepas brasileiras. Assim, a proteção contra *T. gondii* observada em fêmeas cronicamente infectadas por cepas clonais pode ser rompida após a reinfeção com parasitos pertencentes a diferentes genótipos, principalmente quando cepas atípicas estão envolvidas nesse processo (FRANCO et al., 2015).

1.3. Toxoplasmose

T. gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, uma das zoonoses com maior difusão mundial (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014). No Brasil, a taxa de indivíduos com toxoplasmose é considerada alta. Aproximadamente 50% das crianças em idade escolar e entre 50 a 80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos contra *T. gondii* (DUBEY et al., 2012). Embora normalmente cause uma infecção branda ou assintomática em indivíduos imunocompetentes, o parasito pode causar uma doença grave se for transmitido congenitamente ou quando a infecção é adquirida por pessoas imunossuprimidas como indivíduos HIV positivos (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). O risco de mulheres adquirirem o parasito durante a gestação e ocorrer transmissão vertical é alto. Segundo estudos com crianças no Brasil, a partir da pesquisa de anticorpos IgM antígeno-específicos, entre 5 a 23 crianças nascem infectadas por *T. gondii* a cada 10.000 recém-nascidos. A maioria das crianças com toxoplasmose congênita desenvolve sintomas ou sinais de toxoplasmose clínica, destas, algumas morrem após o nascimento, 35% adquirem problemas neurológicos, 80% doenças oculares e 40% sofrem perda de audição (DUBEY et al., 2012).

A doença ocorre em dois cursos: fase aguda e fase crônica. Durante o período inicial da infecção que caracteriza a fase aguda da toxoplasmose ocorre a multiplicação rápida de taquizoítas em diferentes tipos de células. Algumas manifestações clínicas como febre, dor de garganta, mialgia, cefaléia e coriorretinite podem ocorrer. Durante essa fase proliferativa, a toxoplasmose pode causar a morte do hospedeiro (principalmente de pessoas imunossuprimidas ou fetos). Entretanto, em casos de indivíduos imunocompetentes, a multiplicação dos taquizoítas é interrompida devido ao desenvolvimento da resposta imune e ocorre formação de cistos teciduais contendo bradizoítas, caracterizando a fase crônica da infecção (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; CENCI-GOGA et al., 2011; SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014). O mecanismo da permanência indefinida dos cistos nos tecidos dos hospedeiros não é muito bem compreendido, porém, alguns pesquisadores acreditam que, periodicamente, alguns cistos se rompem, liberando os bradizoítas que se diferenciam em taquizoítas, invadindo novas células formando assim novos cistos (TENTER; HICKEROTH; WEISS, 2000; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

A manifestação da doença em imunocomprometidos (HIV positivos, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças autoimunes) está relacionada com a reativação de cistos pré-existentes, na grande maioria dos casos. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas e podem levar o paciente a óbito (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESSAT, 2011; ROBERT-GANGNEAUX; DARDÉ, 2012).

O diagnóstico para detectar a presença de *T. gondii* pode ocorrer indiretamente por métodos sorológicos ou diretamente por meio de bioensaio, cultura celular, imunohistoquímica ou pelo diagnóstico molecular por PCR em sangue, líquido amniótico ou placenta (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TALABANI et al., 2010). A identificação do parasito através de métodos diretos como cultura celular ou isolamento por meio de bioensaio é considerada padrão ouro para a confirmação da infecção, mas são técnicas relativamente demoradas e laboriosas (KOMPALIC-CRISTO et al., 2007; ABDUL-GHANI, 2011).

Um dos principais métodos a que se recorre para estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose é a sorologia, que consiste na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, e mais raramente, IgE) anti-*T. gondii* no sangue. De acordo com o perfil sorológico, pode-se determinar a fase de infecção (aguda ou crônica). Os testes

sorológicos mais comumente utilizados são o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) convencional, de captura (IgM ou IgA) ou de avidéz para IgG; a Imunofluorescência Indireta (IFI); o *Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA); Imunoblotting (IB) e o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) (KOTRESHA; NOORDIN, 2010; ABDUL-GHANI, 2011; BONYADI; BASTANI, 2013).

Métodos de prevenção da toxoplasmose são divulgados por programas de educação e saúde pública, recomendando evitar-se o contato com materiais potencialmente contaminados, como carnes cruas, frutas e verduras com higienização deficiente e caixas de areia com dejetos de gatos (OPSTEEGH et al., 2015; SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014).

1.4. Resposta imune a *T. gondii*

Vários mecanismos imunológicos são responsáveis pelo controle da infecção por *T. gondii*, sendo a imunidade celular o componente-chave da resposta imune do hospedeiro contra a replicação do parasito (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). O parasito pode ser detectado de forma direta através do conjunto de moléculas específicas para detecção de protozoários, bem como ser indiretamente detectado pelo reconhecimento de moléculas e eventuais danos teciduais associados à infecção parasitária (YAROVINSKY, 2014). O início da resposta imunológica ocorre pela participação de células da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer* (NK), além de outras células de natureza não hematopoiética (HAUSER; SHARMA; REMINGTON, 1983; FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; SANECKA; FRICKEL, 2012), como as células epiteliais intestinais, que podem expressar os mesmos receptores de reconhecimento padrão presentes em células da imunidade inata (SANDERSON; WALKER, 2007). Existem mais de dez tipos de receptores de reconhecimento padrão, que são também denominados *toll like receptors* (TLR), constituintes da membrana dessas células de defesa, que são capazes de reconhecer proteínas de superfície dos parasitos (SCANGA et al., 2002). Dois exemplos são o TLR4 e TLR9, receptores muito importantes, uma vez que camundongos deficientes destes dois receptores não apresentam inflamação intestinal mediante infecção (MINNS et al., 2006; HEIMESAAT et al., 2007).

Estudos mostram que uma das formas de ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs) se dá pela interação direta com o parasito pelo reconhecimento da profilina,

uma proteína essencial para sobrevivência do protozoário que regula sua motilidade e invasão à célula hospedeira. O reconhecimento ocorre por receptores TLRs que levam ao recrutamento da molécula adaptadora MyD88 para o início de uma cascata imune de sinalização. A ativação dessa cascata resulta no aumento de IL-12 e IFN- γ pelas APCs (HUNTER; SIBLEY, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014). As APCs secretam citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral (TNF), que induzem linfócitos TCD4⁺ a produzirem interferon (IFN)- γ (GAZZINELLI et al., 1994; HUNTER et al., 1995; DENKERS, 2010; JOHH; WENINGER; HUNTER, 2010; SANECKA; FRICKEL, 2012). Esta citocina exerce muitas atividades biológicas importantes, dentre elas a ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos como a produção de óxido nítrico (NO), a indução da citotoxicidade de linfócitos TCD8⁺, o aumento da expressão de moléculas MHC-II (LANG; GROB; LUDER, 2007), a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, a prevenção da ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reativação do parasito no hospedeiro (SKARIAH; McINTYRE; MORDUE, 2010).

O parasito *T. gondii* também induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), que demonstrou ser de extrema importância para o controle de *T. gondii*. Camundongos MIF nocautes (MIF^{-/-}) foram mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* quando infectados pelas cepas ME49 ou RH em relação aos animais selvagens (FLORES et al., 2008). Tal susceptibilidade ocorre devido a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β , IFN- γ , TNF e IL-18 (FLORES et al., 2008), e a diminuição da maturação de células dendríticas, prejudicando a resposta imune inata contra *T. gondii* (TERRAZAS et al., 2010). Estes dados sugerem que MIF age na regulação da função de células do sistema imune inato em animais infectados por *T. gondii* (FLORES et al., 2008; TERRAZAS et al., 2010), mostrando que esta citocina tem um papel protetor contra este parasito. Além disso, alguns trabalhos publicados nos últimos anos evidenciaram um importante papel de MIF nos processos inflamatórios e no controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal, especialmente em células trofoblásticas humanas (FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2011; SILVA et al., 2012).

A produção dessas citocinas está associada à ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. Os linfócitos TCD8⁺ são células efetoras caracterizadas pela secreção de citocinas envolvidas na resistência do hospedeiro ao parasito e na atividade citotóxica. Essa função torna os linfócitos importantes por induzirem a apoptose

direta contra taquizoítas ou células infectadas (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). Já os linfócitos TCD4⁺, além de auxiliarem na manutenção da resposta das células TCD8⁺, regulam vários mecanismos imunes contra *T. gondii* (COMBE et al., 2005; JONGERT et al., 2010). Existem, inclusive, diversas subpopulações de linfócitos TCD4⁺, que geralmente são diferenciadas pelo perfil de citocinas predominante no microambiente em que se encontram. Dentre elas, os linfócitos T helper 1 (Th1) produzem citocinas pró-inflamatórias essenciais para o controle da infecção por patógenos intracelulares; e os linfócitos T helper 2 (Th2) que secretam citocinas anti-inflamatórias envolvidas no controle de reações inflamatórias. As citocinas liberadas por estas subpopulações induzem a liberação de outros fatores por células vizinhas capazes de recrutar e ativar mais APCs. Desta forma, as células do sistema imune inato e adaptativo se comunicam, e em casos de infecção atuam para intensificar a resposta imunológica efetora contra o patógeno e conter a disseminação da infecção pelo organismo (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

Os macrófagos também são outro tipo celular necessários para a proteção do hospedeiro, pois além de atuar na fagocitose e apresentação de antígenos aos linfócitos, secretam citocinas pró-inflamatórias importantes como IL-12 e TNF, que ativam e auxiliam as células da imunidade adaptativa (ROBBEN et al., 2004; HUNTER; SIBLEY, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014). A IL-12 produzida pelos macrófagos induz os linfócitos a secretarem IFN- γ , que medeia a resistência contra *T. gondii*, promovendo vários mecanismos intracelulares para inibir a multiplicação do parasito (MELO et al., 2011; DUPONT et al., 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014). Além disso, IFN- γ no microambiente inflamatório regula a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e espécies reativas do oxigênio (ROS) por macrófagos, que são fatores tóxicos importantes para a eliminação do parasito (STURGE; YAROVINSKY, 2014; YAROVINSKY, 2014).

Durante a infecção por *T. gondii* ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias. Em indivíduos imunocompetentes são produzidas também citocinas anti-inflamatórias, em menores níveis, para que ocorra a proteção contra o parasito e o controle da resposta inflamatória na tentativa de evitar danos teciduais (GUDE et al., 2004). Durante a gravidez, a resposta imune é marcada pelo balanço entre os perfis pró-inflamatório, essencial nos estágios iniciais e no parto, e predominantemente anti-inflamatório (VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2009; SALAMONE et al., 2012). Assim, há uma conversão para o perfil imunológico do

tipo Th2 na gestante, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, e fator de transformação do crescimento (TGF) β (MILLER et al., 2009; DENNEY et al., 2011).

A maior susceptibilidade de gestantes à toxoplasmose está relacionada ao perfil de citocinas anti-inflamatórias predominante durante a maior parte do período gestacional. Assim, para evitar a rejeição ao feto, acaba influenciando a maior susceptibilidade à infecção parasitária e, conseqüentemente, o risco de infecção placentária e transmissão vertical da toxoplasmose (SANTOS et al., 2008; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESSAT, 2011).

1.5. Resposta imunológica de macrófagos mediante infecção por *T. gondii*

Os macrófagos são importantes populações de células da imunidade inata necessárias para a proteção do hospedeiro (STURGE; YAROVINSKY, 2014). Estas células são altamente plásticas e respondem a uma variedade de estímulos do microambiente através da alteração do seu fenótipo e função. No ambiente inflamatório, os macrófagos podem ser ativados por vários fatores exógenos e endógenos, que irão definir o tipo de ativação (clássica ou alternativa) (VERRECK et al., 2004; AMBARUS et al., 2012; WANG et al., 2014).

A ativação clássica (macrófagos M1) e alternativa (macrófagos M2) de macrófagos se assemelha a polarização Th1 e Th2 de células T e, representa dois extremos de uma mudança dinâmica dos estados da ativação dos macrófagos (WANG et al., 2014). Em resposta à vários estímulos presentes no ambiente da inflamação (como produtos microbianos, células danificadas, linfócitos ativados) ou condições fisiopatológicas, os macrófagos são induzidos por diferentes vias de polarização e adquirem fenótipos (macrófagos M1 ou macrófagos M2) que depende do fator estimulador (O'SHEA; PAUL, 2010). Assim, se macrófagos são ativados por lipopolissacarídeo (LPS), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou citocinas do tipo Th1 desencadeia-se polarização para macrófagos M1 (SINDRILARU et al., 2011). Enquanto que, a ativação por citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-13, IL-10, fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (FLEETWOOD et al., 2007), complexos imunes, glucocorticóide, secosteróide (vitamina D3) e hormônios induzem a ativação alternativa de macrófagos para o tipo M2 (GOERDT et al., 1999; GORDON, 2003).

Os macrófagos M1 são produtores de fatores pró-inflamatórios, eficazes na apresentação de antígenos, morte de parasitos intracelulares, resistência contra tumores

(MOSSER, 2003; O'SHEA; PAUL, 2010; SINDRILARU et al., 2011; WANG et al., 2014), e, além disso, são produtores proficientes de moléculas efetoras como oxigênio reativo e intermediários de nitrogênio (GOERDT et al., 1999; MOSSER, 2003). Este fenótipo apresenta marcadores de superfície celular característicos como CD40 e CD64, e geralmente apresentam-se com formato fusiforme (VOGEL et al., 2014).

Os macrófagos M2 exibem atividade anti-inflamatória e podem potencializar a resposta Th2 e, ao mesmo tempo, antagonizar a resposta de macrófagos M1 (SINDRILARU et al., 2011). Além disso, participam da regeneração de tecidos e angiogênese, através da secreção de fatores de crescimento e precursores da matriz extracelular e também tem como função a tolerância imunológica (GORDON; TAYLOR, 2005; FLEETWOOD et al., 2007; MANTOVANI et al., 2011; WANG et al., 2014). Em sua grande maioria, os macrófagos M2 apresentam os marcadores CD163, CD206 e receptor de manose (MR) em sua superfície celular e possuem morfologia circular (LIU et al., 2013; VOGEL et al., 2014).

Estudos *in vitro* revelaram a existência de mais dois tipos de macrófagos pertencentes ao perfil M2. O fenótipo até então conhecido por ser ativado por IL-4 e IL-13 passou a ser denominado de M2a. Os macrófagos M2b são ativados por complexos imunes juntamente com ligantes de TLR, responsáveis pela regulação imunológica. Enquanto que os macrófagos M2c, também conhecidos por macrófagos regulatórios ou desativados, são aqueles induzidos por IL-10, cuja função consiste na tolerância imunológica e remodelamento tecidual. Neste último tipo de fenótipo, incluem-se os macrófagos decíduais, importantes durante a gravidez, por manter a tolerância e homeostase na interface materno-fetal (MANTOVANI et al., 2004; SVENSON-AVERLUND; ERNERUDH, 2015).

A polarização de macrófagos é modulada pelo metabolismo de arginina, bem como pela disponibilidade desta no meio extracelular. A mudança para fenótipo M1 ou M2 ocorre dependendo da concentração ou produção das enzimas iNOS e arginase, pois ambas utilizam o mesmo substrato, a arginina, para sua atividade (RATH et al. 2014). Estas enzimas possuem funções opostas e estão envolvidas na resistência e susceptibilidade dos hospedeiros em uma infecção (MILLS, 2001; PESCE et al., 2009; RATH et al., 2014). A alta concentração de arginase induz a conversão da arginina em subprodutos como a ornitina e ureia que propiciam a proliferação de células e patógenos (RATH et al., 2014). Por outro lado, macrófagos M1 são produtos da via da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que faz a hidrólise da arginina para citrulina e óxido nítrico (NO), importantes na atividade inflamatória, principalmente no controle da replicação de parasitos como *T. gondii* (MILLS, 2001; PESCE

et al., 2009; RATH et al., 2014). Em contrapartida, os potenciais efeitos patológicos da alta concentração de NO são limitados porque a arginase compete com iNOS pelo mesmo substrato, e de certo modo, a atividade de arginase modula a produção de NO pela redução da disponibilidade de arginina (COOK et al., 1994; CHANG; LIAO; KUO, 1998).

Os macrófagos podem alternar seu fenótipo, de modo que, macrófagos M1 podem se diferenciar em M2 e vice versa (ITALIANI et al., 2014; ITALIANI; BORASCHI, 2014). A capacidade de alterar dinamicamente o fenótipo deve ser cuidadosamente regulada para evitar respostas inflamatórias descontroladas sem o comprometimento da resolução da inflamação (MCCORMICK; HELLER, 2015). Este controle ocorre por um conjunto de vias de sinalização e redes de regulação de transcrição e pós-transcrição (O'SHEA; PAUL, 2010). A proteína supressora de sinalização de citocinas (SOCS) é uma das mediadoras que atuam na regulação da polarização de macrófagos e na sinalização de citocinas (MCCORMICK; HELLER, 2015). As SOCS são expressas em todas as células e podem ser induzidas por uma variedade de estímulos que incluem citocinas, ligantes de receptores TLR, complexos imunes e hormônios (YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). A expressão destas proteínas nos macrófagos é baixa, mas são rapidamente expressas após ativação das células, sendo que dos oito membros das SOCS, as SOCS1 e SOCS3 têm papel importante na regulação da polarização (LIU et al., 2008; QIN et al., 2012; ARNOLD et al., 2014; MCCORMICK; HELLER, 2015).

A troca dos fenótipos M1-M2 durante a transição da fase aguda para a fase crônica em doenças fornece proteção ao hospedeiro contra inflamações descontroladas. No entanto, esta troca fenotípica poderia favorecer patógenos que possuam estratégias para interferir na atividade microbicida dos macrófagos M1 (PATHAK et al., 2007; BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; BENOIT et al., 2008; SICA; MANTOVANI, 2012).

Ao longo de uma infecção, *T. gondii* tem habilidade para induzir a polarização dos macrófagos associada à virulência, carga parasitária local e patologia (JENSEN et al., 2011). Em relação à polarização de macrófagos frente a cepas clonais de *T. gondii*, cepas do tipo I e III podem induzir a polarização para macrófagos M2 e cepas do tipo II desencadear a ativação clássica dos macrófagos (M1) (JENSEN et al., 2011; MELO et al., 2011). Pouco se sabe sobre polarização na presença de cepas atípicas de *T. gondii*. Em um estudo com isolados chineses, a cepa mais virulenta TgCtwh3 provocou a polarização para macrófagos M2. Já a cepa TgCtwh6, menos virulenta, induziu a polarização para M1 (LIU, et al., 2013).

1.6. Monócitos da linhagem THP-1

Vários estudos *in vitro* com macrófagos são realizados utilizando-se modelos experimentais de linhagens celulares bem estabelecidas em cultura. As células mielomonocíticas da linhagem THP-1 (monócitos THP-1) foram isoladas do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Estas células permitem o desenvolvimento de estudos na presença de patógenos como *T. gondii* e podem ser mantidas em cultura por longos períodos. Tais características favorecem a realização de estudos que avaliam a disseminação e a capacidade de *T. gondii* (CHANNON; SEGUIN; KASPER, 2000; BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

Devido às similaridades metabólicas e morfológicas, estas células podem ser diferenciadas em macrófagos através do forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), 1,25-dihidroxitamina D3 (VD3), ácido retinóico ou citocinas (TNF, IFN- γ) (TSUCHIYA et al., 1982; CHEN; DEFRANCES; ZARNEGAR, 1996; CHEN; CATHARINE, 2004; HUMENIUK-POLACZEK; MARCINKOWSKA, 2004; PARK et al., 2007; DAIGNEAULT et al., 2010). Os ésteres de forbol como o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) são capazes de induzir a diferenciação completa de monócitos em macrófagos (AUWERX, 1991; AUWERX et al., 1992; PARK et al., 2007; DAIGNEAULT et al., 2010). A diferenciação induzida por PMA ocorre por meio da ativação da proteína quinase C (PKC) e se assemelha a diferenciação induzida por diacilglicerol que ocorre naturalmente nos macrófagos humanos (REYES et al., 1999; CAO et al., 2014).

Os macrófagos THP-1 diferenciados são utilizados como modelo *in vitro* de macrófagos humanos em estudos envolvendo doenças inflamatórias (KRAMER; WRAY, 2002; UEKI et al., 2002; HJORT et al., 2003). Pelo fato destas células se comportarem como macrófagos derivados de monócitos nativos, a linhagem celular fornece um modelo válido para estudar os mecanismos envolvidos na diferenciação de macrófagos (AUWERX, 1991).

Não há dados na literatura que mostre a polarização de macrófagos humanos infectados por cepas atípicas e clonais de *T. gondii*. O melhor entendimento sobre o perfil de macrófagos gerado após infecção por tais cepas é importante de modo a esclarecer o papel destas células durante infecção por *T. gondii*, além de compreender o comportamento de cada cepa (atípica e clonais) nos macrófagos.

JUSTIFICATIVA

O parasito *T. gondii* é classificado em cepas clonais e atípicas de acordo com o seu padrão genético. Durante a resposta imunológica, os macrófagos têm importante função no controle do parasito, de modo que, durante uma resposta imunológica, estas células participam ativamente da resposta imune do hospedeiro, e podem ser polarizadas para o perfil M1 ou M2, de acordo com fatores presentes no ambiente da inflamação, sendo que *T. gondii* também pode induzir a polarização dos macrófagos.

Considerando que cepas atípicas de *T. gondii* podem causar grave sintomatologia em humanos quando comparado com as cepas clonais, especialmente em pessoas imunocomprometidas e crianças infectadas congenitamente; e, levando em consideração a diferente virulência das cepas clonais, o presente trabalho se justifica pela necessidade de analisar a diferenciação fenotípica de macrófagos humanos infectados por cepa atípica e clonais de *T. gondii*. Pesquisas existentes foram realizadas com macrófagos de camundongo, e o presente trabalho veio a investigar o comportamento de macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1. Nesse sentido, determinar a diferenciação fenotípica de macrófagos infectados com as cepas TgChBrUD2, RH e ME49, é uma importante ferramenta capaz de adicionar dados que favoreçam a compreensão da polarização dos macrófagos humanos infectados por diferentes cepas de *T. gondii* e mediadores produzidos diante da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a polarização *in vitro* de macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 infectados com a cepa atípica TgChBrUD2 e clonais RH e ME49 de *T. gondii*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pelos macrófagos infectados ou não com a cepa atípica (TgChBrUD2) e clonais (RH e ME-49) de *T. gondii*;
- Determinar a produção de ureia e secreção de nitrito pelos macrófagos infectados ou não com a cepa atípica e clonais de *T. gondii*;
- Analisar a morfologia dos macrófagos não infectados e infectados pela cepa atípica e clonais de *T. gondii*;
- Comparar a proliferação intracelular de *T. gondii* em macrófagos infectados pela cepas atípica e clonais de *T. gondii*;
- Avaliar a expressão de marcadores celulares das populações de macrófagos M1 e M2 em macrófagos THP-1 infectadas ou não com a cepa atípica e clonais de *T. gondii*.

3. METODOLOGIA

3.1. Manutenção das células THP-1 e BeWo em cultura

As células THP-1 (linhagem monocítica humana) e células BeWo (células de coriocarcinoma humano) foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Ambas as linhagens celulares foram cultivadas em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² contendo meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*; Gibco, Paisley, Inglaterra) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina) e 25 mM de HEPES (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) e foram incubadas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2008; CASTRO et al., 2013).

As células THP-1 são células cultivadas em suspensão por serem não aderentes. Brevemente, o SBF foi centrifugado a 400 x g durante 10 minutos antes de ser adicionado ao meio RPMI. Os repiques nas células THP-1 foram realizados a cada dois dias, o sobrenadante com as células foi retirado da garrafa de cultura e transferido para tubos de 15ml e centrifugado a 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante,

as células foram ressuspensas em 1ml de meio com soro, distribuídas em novos frascos de cultura e incubadas (CASTRO et al., 2013).

Diferentemente das células THP-1, as células BeWo são células aderentes. O procedimento do repique foi semelhante com a diferença de que, inicialmente, foi realizado a lavagem das células com meio RPMI a 10% de SBF, e em seguida incubadas com solução de tripsina (Sigma). Posteriormente, as células foram lavadas e retiradas dos frascos de cultura com uso de meio a 10% de SBF, seguido por centrifugação (BARBOSA et al., 2008; CASTRO et al., 2013).

3.2. Manutenção *in vivo* e *in vitro* das cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*

As cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 foram mantidas, primeiramente, na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da UFU. Os animais foram mantidos livres de patógenos específicos em ciclos diários de 12 horas de luz/escuro, com dieta *ad libitum* e temperatura média de 25 °C. Todos os procedimentos experimentais utilizando estes animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991) e pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia. Os experimentos foram aprovados pelo CEUA sob o protocolo de número 049/11 (ANEXO 1).

Realizou-se inoculação intraperitoneal em camundongos através do inóculo com 100 taquizoítas de cada cepa. Cada camundongo recebeu o inóculo de apenas uma cepa. Após análise da morbidade durante infecção dos camundongos pelas cepas, os exsudatos peritoneais de camundongos previamente infectados foram obtidos por meio de lavagens da cavidade abdominal com meio de cultura (RPMI 1640) sem soro e, posteriormente, as suspensões parasitárias foram centrifugadas a 720 x g por 5 minutos. Os taquizoítas resultantes na fração *pellet* foram ressuspensos e, em seguida foram transferidos para garrafas de cultura contendo células BeWo em monocamada com 15 mL de meio RPMI com 2% de SBF e incubados a 37 °C e 5% de CO₂. Os repiques em cultura foram feitos a cada 48 horas.

3.3. Diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos

O sobrenadante de cultura contendo monócitos THP-1 foi removido dos frascos de cultura e centrifugado a 400 x g por 5 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas a uma proporção de 5×10^6 células/garrafa, mantidas em garrafas de cultura de 75cm² em 15mL de meio a 10% de SBF e 1,5µL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Biogen Com. Dist. Ltda, Sumarezinho, SP, Brazil) a 10 ng/mL durante 48h a 37 °C e 5% de CO₂ (PARK et al., 2007). O processo de diferenciação de monócitos em macrófagos foi verificado através da análise da adesão celular dos macrófagos às garrafas de cultura. Após diferenciação, os macrófagos foram lavados com meio de cultura a 10% de soro e tripsinizados por 5 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas e retiradas de frascos de cultura com meio a 10% de soro, transferidas para tubos de 15 ml e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, os macrófagos foram homogeneizados em meio com soro (GUIRELLI et al., 2015). Esses macrófagos foram utilizados em todos os experimentos.

3.4. Infecção de macrófagos pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*

Os macrófagos obtidos como descrito no item anterior foram contados em câmara de Neubauer, utilizando-se 20 µl do *pellet* adicionados de 20 µl de azul de Tripan. Os macrófagos foram ajustados a um volume de 4×10^5 células e cultivados em placas de 24 poços (Caltech, Uberlândia, MG, Brasil) em 210µL de meio a 10% de SBF por poço. As placas foram mantidas em estufa por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, a infecção dos macrófagos ocorreu com taquizoítas das cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 na proporção de 2 parasitos por célula (2:1), mantidos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas. As células controle não infectadas foram incubadas somente com meio. Finalizado o período de infecção, a placa foi centrifugada a 400 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA e nitrito pela reação de Griess. Para a coleta das células, foi adicionado tripsina e a placa foi incubada por 3 minutos. A tripsina foi inativada com meio a 10% de soro, os macrófagos foram retirados da placa, transferidos para *eppendorfs* (Axygen Scientific, Inc., Bishop Meadow Rd, Loughborough, United Kingdom) e centrifugados a 15000 x g a 24 °C por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e os macrófagos estocados a -80 °C. As células foram utilizadas para a quantificação de ureia, análise morfológica, análise do parasitismo por qPCR e a

expressão dos receptores CD64 (marcador de M1), CD163 ou CD206 (marcadores de M2) por citometria de fluxo.

3.5. Dosagem de citocinas por ELISA

As citocinas MIF, IL-6, TGF- β 1, IFN- γ , IL-10, TNF e IL-12p40 foram mensuradas nos sobrenadantes de macrófagos nas diferentes condições experimentais por ELISA sanduíche, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences, San Diego, CA, USA or R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Brevemente, placas foram incubadas com anticorpo de captura. A seguir as placas foram bloqueadas e incubadas com as amostras ou com as respectivas citocinas recombinantes para a construção da curva padrão. Após serem lavadas as placas foram incubadas com anticorpo de detecção biotiniliado específico para cada citocina. Os ensaios foram desenvolvidos usando estreptavidina acoplada com peroxidase (HRP) e revelados com 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). As concentrações de cada citocina foram determinadas pela extrapolação da curva padrão com concentrações conhecidas de cada uma das citocinas. Os dados foram demonstrados em pg/mL de acordo com a referência da curva padrão. O limite de detecção obtido para cada análise foi 62.5 pg/mL (MIF); 7.8 pg/mL (IL-10 e TNF); 4.7 pg/mL (IL-6 e IFN- γ); 125 pg/mL (TGF- β 1) e 31.25 pg/mL (IL12p40).

3.6. Dosagem de nitrito

O sobrenadante dos macrófagos foi analisado pela reação de Griess para dosar a produção de nitrito, o subproduto do óxido nítrico (GREEN et al., 1982). Os sobrenadantes foram adicionados em duplicata às placas de 96 poços e misturados na proporção de 1:1 com 1% de sulfanilamida dicloridrato e 0,1% cloreto de alfa-naftiletlenodiamina em 2,5% de ácido fosfórico (H₃PO₄). A absorbância foi lida em um leitor de placas a 570 nm, e a concentração foi determinada em referência a uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) com concentrações que variam de 5 a 200 μ M/ml.

3.7. Mensuração da atividade de arginase em macrófagos

A atividade de arginase foi analisada através da dosagem de ureia no lisado de macrófagos. Para isso, foi feita a lise das células com tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) [50 mmol/l de Tris, 150 mmol/l de NaCl, Triton X-100 (1%), deoxiclato de sódio (1%) e SDS (0.1%); pH 7.5] e adicionados coquetéis de inibidores de protease. O homogenato foi centrifugado a 15000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para a dosagem da ureia pelo kit Ureia UV Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). As amostras foram adicionadas a placas de 96 poços para determinação da concentração de ureia (mg/dl), e a dosagem seguiu-se de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi detectada em leitora de microplaca a 340 nm e $37 \pm 0,2$ °C. A atividade de arginase foi determinada pela quantidade de ureia detectada.

3.8. Análise morfológica de macrófagos não infectados e infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49

Macrófagos não infectados ou infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 foram fotografados para análise da morfologia celular e para demonstração de dados do parasitismo. Os procedimentos de plaqueamento foram os mesmos descritos acima com a diferença de que os macrófagos foram cultivados em lamínulas de vidro circulares de 13 milímetros de diâmetro em placas de 24 poços. Após 24 horas de infecção, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas em formol tamponado com fosfato a 10% por 24 h. Posteriormente, as lamínulas com os macrófagos foram corados com 1% de azul de toluidina (Sigma) por 10 segundos. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e as células analisadas em um fotomicroscópio acoplado a uma câmera (Olympus BX51 and Olympus DP70; Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan).

O número de células circulares e fusiformes foi quantificado em microscopia de luz (Optiphase, Inc., Van Nuys, CA, Estados Unidos) por meio da análise de lamínulas contendo macrófagos controle, macrófagos infectados por TgChBrUD2, RH ou ME49. Três lamínulas foram depositadas em uma lâmina. As lamínulas com as células foram divididas em quatro quadrantes. Em um ensaio cego, foram contadas 100 células, para cada quadrante microscópico (aumento original 40x). O experimento foi realizado em triplicata.

3.9. Análise da proliferação intracelular por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A detecção da proliferação intracelular das cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii* nos macrófagos foi determinada por qRT-PCR. O DNA total foi extraído dos macrófagos usando o kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi quantificado por espectrofotometria UV (NanoDrop Lite Spectrophotometer; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A qRT-PCR foi realizada por meio de *StepOnePlus® Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) com corente fluorescente de ligação ao DNA do kit *Go Taq® qPCR Master Mix* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin USA). As condições de termociclagem bem como os oligonucleotídeos foram realizados conforme descrito por Wahab e colaboradores em 2010 (WAHAB et al., 2010). Os primers (*forward*, 5'-CACAGAAGGGACAGAAGT-3' and *reverse*, 5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3') foram utilizados para amplificação do DNA de *T. gondii* correspondente ao gene repetitivo de 529 pares de base, AF146527 (Genbank). Controles positivos e negativos do parasito foram incluídos em cada ensaio.

3.10. Análise da polarização através da expressão de CD64, CD163, CD206 em macrófagos por citometria de fluxo

O plaqueamento e a infecção dos macrófagos ocorreu da mesma forma como descrito acima, com a diferença de que foram plaqueadas 1×10^6 células e cultivadas em placas de 6 poços (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA) em 2 mL de meio a 10% de SBF por poço. Os macrófagos foram removidos das placas, lavadas com PBS gelado estéril, transferidos para tubos de 15 mL e centrifugados a $400 \times g$ por 7 minutos. Posteriormente, as células foram homogeneizadas em PBS com 0,5% de BSA (Sigma), a concentração celular foi ajustada para 1×10^5 células/100 μL e as células foram transferidas para tubos de poliestireno de 15x75 mm (BD Biosciences). Em um mesmo tubo de cada condição, foram adicionados 3 μL do anticorpo monoclonal anti-CD64 conjugado com APC (BD Biosciences), 10 μL do anticorpo monoclonal anti-CD206 conjugado com PE (BD Biosciences) e 3 μL do anticorpo monoclonal anti-CD163 conjugado com FITC (BD Biosciences). Como controle, foram

adicionados 5 μ L do isotipo controle irrelevante IgG de camundongo (Milipore, São Paulo, SP, Brasil). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 4 °C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a marcação, foi adicionado 1mL de PBS com 0,5% de BSA (Sigma). O sobrenadante foi descartado e as células com os anticorpos foram fixadas com 300 μ L de fixador MFF (paraformaldeído e cacodilato de sódio). Em seguida, foi realizada a leitura de 20.000 células de cada condição experimental no citômetro FACSCalibur BD™ (BD Company).

3.11. Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram expressas como média \pm erro padrão da média (SEM) e as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni em casos de testes paramétricos; dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cepa atípica e clonais de *T. gondii* provocam aumento da produção de MIF e diminuição de IL-10 nos macrófagos, e TgChBrUD2 induz o aumento de IL-6

Para verificar as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias liberadas pelos macrófagos, durante infecção por cepas clonais e atípica de *T. gondii*, realizou-se a dosagem de citocinas IL-10, MIF, IL-6, TGF- β 1, TNF, IFN- γ e IL-12p40 por ELISA sanduíche em sobrenadantes de culturas de macrófagos. A análise dos dados mostrou que os macrófagos infectados com as cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 diminuíram a produção de IL-10 (Figura 2A) e aumentaram a produção de MIF (Figura 2B) quando comparado aos macrófagos controle. Além disso, macrófagos infectados com ME49 demonstraram maiores níveis de produção de MIF em relação as células infectadas pelas cepas TgChBrUD2 ou RH (Figura 2B). Durante a infecção por TgChBrUD2, os macrófagos apresentaram produção de IL-6

significativamente maior em comparação ao controle. A infecção dos macrófagos por RH e ME49 mostraram menores níveis de IL-6 quando comparado com as células infectadas por TgChBrUD2 (Figura 2C). A produção de TGF- β 1 (Figura 2D), TNF (Figura 2E) e IFN- γ (Figura 2F) também foi verificada, mas não apresentaram aumento significativo em relação ao controle. A produção da citocina IL12p40 pelos macrófagos não foi detectável (dados não mostrados).

4.2. Os macrófagos infectados pela cepa atípica aumenta a liberação de nitrito e a infecção por ME49 e TgChBrUD2 induz a redução da secreção de ureia nos macrófagos

A atividade de arginase foi analisada através da dosagem de ureia liberada pelos lisados de macrófagos infectados ou não por *T. gondii*. Os resultados mostraram redução significativa na produção de ureia nos macrófagos infectados pelas cepas TgChBrUD2 e ME49 comparado com o controle. Os macrófagos infectados por RH não apresentou diferença estatística em relação a produção de ureia (Figura 3A).

A produção de nitrito foi verificada a partir do sobrenadante de macrófagos infectados ou não por *T. gondii* através da reação de Griess. A análise mostrou que houve aumento de nitrito nos macrófagos infectados por TgChBrUD2 em relação ao controle. A infecção por RH mostrou níveis significativamente menores de nitrito quando comparado aos macrófagos infectados por TgChBrUD2. Os macrófagos infectados por ME49 mostraram tendência ao aumento de nitrito (Figura 3B).

4.3. A proliferação de *T. gondii* é maior nos macrófagos infectados por RH

A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada por qRT-PCR- para verificar possíveis diferenças na replicação do parasito entre os diferentes tipos de cepas. Os resultados mostraram que a proliferação da cepa RH nos macrófagos foi significativamente maior quando comparado com as cepas TgChBrUD2 e ME49 (Figura 5A). As fotomicrografias representativas (Figs. 5B-D) confirmaram esses dados, onde é possível observar maior quantidade de parasitos extracelulares nos macrófagos infectados com a cepa RH (Figura 5C) em comparação com os macrófagos infectados com TgChBrUD2 (Figura 5B) ou macrófagos infectados com ME49 (Figura 5D).

4.4. Macrófagos infectados com TgChBrUD2 apresentaram predomínio da morfologia fusiforme

Para verificar a morfologia dos macrófagos do grupo controle e dos grupos infectados por cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 de *T. gondii*, as lamínulas com os macrófagos foram analisadas em um fotomicroscópio. A morfologia de macrófagos foi analisada após 24 horas de infecção e os macrófagos com forma circular ou fusiforme foram contados. Foi observado que macrófagos não infectados (controle) com formato circular foram predominantes em relação aos macrófagos com formato fusiforme (Figura 6A). Além disso, macrófagos controle com morfologia circular foram encontrados em maior quantidade quando comparado com macrófagos com formato circular durante infecção por TgChBrUD2 e RH. A infecção por TgChBrUD2 mostrou predomínio de macrófagos com formato fusiforme em relação ao formato circular. Além disso, a infecção pela cepa atípica produziu maior número de macrófagos fusiformes quando comparado ao controle com formato fusiforme. A infecção pelas cepas RH e ME49 não mostraram diferença estatística em relação aos macrófagos com formato fusiforme e formato circular (Figura 6A). Fotomicrografias representativas da morfologia dos macrófagos controle, macrófagos infectados com TgChBrUD2, macrófagos infectados com RH e macrófagos infectados com ME49 estão representadas nas figuras 6B, 6C, 6D e 6E, respectivamente.

4.5. A infecção pelas cepas TgChBrUD2, RH ou ME49 induz expressão semelhante de marcadores de superfície em macrófagos humanos

Para verificar se ocorreu polarização dos macrófagos infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*, foi analisada a expressão de marcadores CD163 (marcador de macrófago M2), CD206 (marcador de macrófago M2) e CD64 (marcador de macrófago M1) nos macrófagos não infectados e infectados pelas cepas acima citadas. Foi observada tendência a diminuição do marcador CD64 nos macrófagos infectados por TgChBrUD2, RH ou ME49 em relação ao controle (Figura 7).

5. DISCUSSÃO

Os macrófagos são células da imunidade inata que possuem um fenótipo altamente dinâmico que rapidamente responde a estímulos externos do microambiente e, direciona a resposta imunológica, de modo que podem sofrer polarização e desencadear uma resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória (MCCORMICK; HELLER, 2015). A polarização é desencadeada em resposta a sinais do microambiente e substâncias presentes no local da inflamação (ITALIANI; BORASCHI, 2014). Durante a polarização, os macrófagos podem ser divididos em dois fenótipos/subconjuntos: macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos alternativamente ativados (M2) (MANTOVANI et al., 2013). Esses subconjuntos diferem em relação aos marcadores de superfície, secreção de citocinas e funções efetoras (ITALIANI; BORASCHI, 2014). Os macrófagos M1 estão envolvidos na resposta inflamatória e são produtores de citocinas do perfil Th1 (CASSETA et al., 2011), medeiam defesa contra patógenos bacterianos, vírus e tumores (MARTINEZ; GORDON, 2014), enquanto que, macrófagos M2 são caracterizados pela secreção de citocinas anti-inflamatórias e tem funções imunossupressivas como fagocitose de células apoptóticas, tolerância imunológica e remodelamento tecidual (MANTOVANI et al., 2013). Os macrófagos podem alternar seu fenótipo, de modo que, macrófagos M1 podem se diferenciar em M2 e vice-versa (ITALIANI et al., 2014; ITALIANI; BORASCHI, 2014). Esta troca de fenótipo dos macrófagos pode ser regulada de modo a prevenir respostas inflamatórias incontroladas para resolver o processo inflamatório (MCCORMICK; HELLER, 2015). Cepas de *T. gondii*, clonais ou atípicas, tem capacidade para induzir a ativação específica dos macrófagos e, consequentemente, induzir a polarização (JENSEN et al., 2011; MELO et al., 2011; LIU, et al., 2013), que pode estar associada a virulência, carga parasitária ou patologia (JENSEN et al., 2011).

Os macrófagos da linhagem THP-1 transformados a partir do PMA foram utilizados nesta pesquisa devido a facilidade de transformar os monócitos em macrófagos, bem como pelas semelhanças metabólicas que tais células apresentam em relação à morfologia e fisiologia com os macrófagos humanos nativos. No presente estudo, nós avaliamos a polarização de macrófagos derivados de THP-1 infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii* por meio da produção de citocinas e ureia, secreção de nitrito, análise da morfologia celular, marcadores da superfície celular e proliferação intracelular do parasito.

Os resultados do estudo mostraram que a infecção por TgChBrUD2 induziu aumento da produção de MIF e IL-6 nos macrófagos, ambas citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, houve diminuição da citocina IL-10. Estudos com macrófagos de camundongos infectados com isolados chineses de *T. gondii* mostraram que o isolado menos virulento (TgCtwh6), que provocou polarização dos macrófagos para o tipo M1, induziu aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, enquanto TgCtwh3, outro isolado chinês de maior virulência que induziu a polarização para macrófagos M2, provocou redução na produção desta mesma citocina (LIU et al., 2013). Outro estudo com os mesmos isolados chineses mostrou que TgCtwh6 induziu aumento de IL-12p40 e TNF em macrófagos de camundongos (ZHANG et al., 2013).

No presente estudo, também foi observado que a infecção pelas cepas ME49 e RH, assim como TgChBrUD2 induziu alta secreção de MIF e baixos níveis de IL-10. Além disso, os macrófagos infectados por ME49, cepa do tipo II, foram capazes de promover um aumento significativo de MIF, maior do que a infecção por TgChBrUD2 e RH. Já a cepa RH desencadeou nos macrófagos uma resposta com níveis mais baixos das citocinas pró-inflamatórias quando comparado com os macrófagos infectados por TgChBrUD2 e ME49, embora outras citocinas também pró-inflamatórias não mostraram resultados significativos. Concordando com nossos resultados, estudos com macrófagos de camundongos infectados com a cepa Pru (cepa do tipo II) mostraram indução do aumento da expressão de genes responsáveis pela produção de muitas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12p40/35 e IL-23p40/19 (ROBBEN et al., 2004; JENSEN et al., 2011). Outro estudo mostrou que a cepa do tipo II (Pru) aumentou a produção das citocinas IL-12p40 e TNF (ZHANG et al., 2013). Estudos prévios demonstraram que a infecção por ME49 em células BeWo exibiram uma resposta preferencialmente do perfil pró-inflamatório com altos níveis de secreção de MIF, TNF, IL-12p70, IL-17A e IL-6. Entretanto, contrário aos nossos resultados em relação a infecção por RH, células BeWo infectadas por esta cepa aumentaram a secreção das citocinas anti-inflamatórias TGF- β 1 e IL-10 (ANGELONI et al., 2013). Diferenças no perfil de citocinas encontrado pela RH, pode ser explicado pelo tipo de células utilizada, os macrófagos derivados de THP-1. Os macrófagos humanos são fundamentalmente diferentes dos macrófagos de roedores (SHNEEMANN; SCHOEDEN, 2007). Apesar da resposta imune humana possuir um conjunto de vias que são idênticos para os roedores, e provavelmente todos os mamíferos; os humanos tem evoluído algumas vias que são diferentes nos roedores, que foram criadas por pressões evolutivas de novos patógenos causadores de doenças (como

tuberculose, dengue, entre outras), novos ambientes, e a introdução ou perda de genes dentro do “pool” genético humano (COERS; STARNBACH; HOWARD; 2009). Além disso, diferenças na virulência entre vários tipos de cepas de *T. gondii* podem estar associadas com vias intracelulares de células hospedeiras que são manipuladas pelo parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012). Nesse sentido, tem sido demonstrado que proteínas do parasito como ROP16 e GRA15 podem influenciar a polarização de macrófagos (JENSEN et al., 2011).

A fim de melhor caracterizar a polarização dos macrófagos pelas cepas atípica e clonais estudadas, fez-se a dosagem de ureia, o subproduto da enzima arginase. Esta enzima é um dos maiores marcadores da ativação alternativa, cuja expressão pode determinar a polarização para macrófagos M2 (MURRAY; WINN, 2011; MILLS, 2012). Pesquisas mostraram que a arginase é altamente expressa nos macrófagos infectados pelas cepas clonais do tipo III (CEP) (JENSEN et al., 2011) e tipo I (RH) (JENSEN et al., 2011; ZHANG et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados em macrófagos de camundongo infectados pela cepa chinesa TgCtwh3 que exibiram maiores níveis de ureia durante infecção (LIU et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Os dados desse estudo mostraram que macrófagos infectados por TgChBrUD2 e ME49 diminuíram a secreção de ureia quando comparado com macrófagos controle. Como a ureia é produzida em um perfil anti-inflamatório de uma infecção, esta diminuição de ureia encontrada em nossos resultados estão de acordo com o perfil de citocinas pró-inflamatório desencadeado por TgChBrUD2 e ME49. Além disso, a atividade da arginase provoca a hidrólise de arginina para L-ornitina e ureia que provocam a proliferação de *T. gondii* (IGARASHI; KASHIWAGHI, 2000; ABDHALLI et al., 2001; ROBERTS et al., 2004; STEMPIN et al. 2010). Esses baixos níveis de ureia durante infecção por TgChBrUD2 e ME49 explicariam nossos resultados da proliferação intracelular que mostrou que estas cepas não tiveram replicação significativa nos macrófagos como observado pela cepa RH.

Assim como a alta concentração de arginase é um dos marcadores da polarização para macrófagos M2, o aumento na secreção de óxido nítrico e seus subprodutos são característicos de macrófagos M1 (MILLS, 2012). O óxido nítrico é produzido por diferentes células pela estimulação de citocinas e desempenha papel importante na resposta imunológica através do controle da replicação de patógenos como *T. gondii* (JAMES, 1995; KHAN et al., 1997), em que uma das suas funções consiste em estimular a saída precoce de *T. gondii* das células (YAN et al., 2015). Nossos resultados mostraram que foi observado aumento significativo na produção de nitrito durante infecção por TgChBrUD2 em relação ao controle

e aos macrófagos infectados por RH. Durante infecção por ME49 foi observado tendência ao aumento de nitrito em relação ao controle. Chen e colaboradores (1996) observaram que os macrófagos diferenciados com PMA de células THP-1 produziram nitrito após estimulação com sílica. Estudo com isolados de *T. gondii* chineses mostrou que o isolado TgCtwh6 induziu alta secreção de nitrito (ZHANG et al., 2013). Pelo fato das cepas do tipo II poderem induzir a polarização para macrófagos M1 (LIESENFELD et al. 1996), nossos resultados corroboram com os dados da literatura, uma vez que os macrófagos infectados por ME49 mostraram aspectos da ativação clássica por ter induzido aumento do perfil de citocinas do tipo Th1, diminuição de ureia e tendência ao aumento de nitrito. Por outro lado, a infecção por RH não induziu aumento de nitrito. Como os macrófagos M1 são produtores de altas quantidades de reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio, nem todos os aspectos da ativação clássica foram observados nos macrófagos infectados por RH. Outros estudos mostraram níveis indetectáveis de nitrito em macrófagos de camundongos infectados pela RH (ZHANG et al., 2013), bem como outras pesquisas mostraram que nenhuma alteração na quantidade deste subproduto do óxido nítrico foi notada em infecção por cepa do tipo I (JENSEN et al., 2011).

A análise da proliferação intracelular do parasito mostrou aumento significativo na quantidade de DNA de *T. gondii* nos macrófagos infectados por RH. Enquanto que, TgChBrUD2 e ME49 não mostraram alta proliferação intracelular como observada pela cepa RH. Altas concentrações de ureia são um dos fatores relacionados a proliferação do parasito (IGARASHI; KASHIWAGHI, 2000; ABDAHALLI et al., 2001; ROBERTS et al., 2004; STEMPIN et al. 2010). Porém esta associação não foi observada durante infecção dos macrófagos pela cepa RH em nosso estudo, pois apresentou alta proliferação intracelular enquanto que, os níveis de ureia não aumentaram significativamente em relação ao controle. Tal fato pode ser explicado pela metodologia utilizada na dosagem de ureia e/ou pelo tipo de macrófago utilizado na pesquisa, que são diferentes em pesquisas realizadas por outros autores (ZHANG et al., 2013). Além disso, os perfis de citocinas presentes no microambiente da inflamação também podem influenciar no parasitismo, pois foi demonstrado em um estudo com macrófagos infectados por cepas de *T. gondii* do tipo I (cepas de alta virulência) menor produção da citocina pró-inflamatória IL-12 e diminuição da eliminação do parasito; em comparação com macrófagos infectados com as cepas do tipo II (cepas de moderada virulência) que registraram maior produção de IL-12 e aumento na eliminação do parasito (KIM et al., 2006). Neste estudo, observou-se que os macrófagos infectados pela RH

induziram um perfil de citocinas com característica pró-inflamatória, mas não mostrou influência sobre a proliferação intracelular. Isto pode ser explicado pelo fato de que cepas virulentas possuam capacidade de evadirem mecanismos de imunidade do hospedeiro (HUNTER; SIBLEY, 2012). Os fatores de virulência específicos aos tipos de cepas de *T. gondii* interferem de formas diferentes na resposta imune e podem estar associados com a capacidade que o parasito desenvolveu de diminuir a morte celular do hospedeiro, bem como modular a produção de citocinas (LUDER et al., 2009; HUNTER; SIBLEY, 2012; ANGELONI et al., 2013). Estudos recentes mostraram a importância das proteínas IRGs (*immunity-related GTPases*) na resposta imune contra *T. gondii* (ZHAO et al., 2009; REESE; SHAH; BOOTHROYD, 2014). As IRGs são proteínas do grupo das GTPases (enzimas que hidrolisam o GTP), que são recrutadas para a membrana do vacúolo parasitóforo e causam sua ruptura, facilitando a eliminação do parasito por células do sistema imunológico (TAYLOR et al., 2000). Quando foi analisado recrutamento dessas proteínas após infecção por *T. gondii*, observou-se que as cepas do tipo II (ME49) induziram maior recrutamento de IRGs em comparação com as cepas do tipo I (RH) (ZHAO et al., 2009; STEINFELDT et al., 2010). Alguns fatores de virulência também estão relacionados com esta diferença no parasitismo e acredita-se que a ROP5 e ROP18 sejam responsáveis pela inibição das proteínas IRG em cepas virulentas (BEHNKE et al., 2012; REESE; SHAH; BOOTHROYD, 2014).

Estudos prévios demonstraram que TgChBrUD2 apresentou significativa formação de taquizoítas em fêmeas de *C. callosus*, especialmente no fígado dos roedores (FRANCO et al., 2014). Diferentemente, não foi observado nos resultados alta replicação de TgChBrUD2 nos macrófagos. Nos dados da análise de citocinas mostraram que macrófagos infectados pela cepa brasileira aumentaram a produção de MIF e IL-6, citocinas pró-inflamatórias importantes no controle do parasito (GOMES et al., 2011; FRANCO et al., 2011; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014). Apesar de IL-6 poder exercer função anti-inflamatória (SCHELLER et al., 2011), nos macrófagos esta citocina é produzida por macrófagos M1 relacionada a atividades microbidas (MANTOVANI et al., 2002; DURAFORT et al., 2012; SICA; MANTOVANI, 2012). Além disso, mesmo em tratamentos que induzem respostas anti-inflamatórias, MIF é secretada em altos níveis e atua no controle do parasito (FRANCO et al., 2011). Nesse sentido, MIF e IL-6 podem ter atuado conjuntamente para impedir a proliferação intracelular de TgChBrUD2. É importante considerar também que, os macrófagos infectados por TgChBrUD2 aumentaram os níveis de nitrito em relação ao controle não infectado, e pelo fato deste subproduto do óxido nítrico também ser importante

no controle de *T. gondii* (JAMES, 1995; KHAN et al., 1997), justifica nossos resultados encontrados na análise de proliferação intracelular.

De acordo com o estímulo e com os fatores presentes no microambiente da inflamação, os macrófagos podem ser estimulados a mudarem sua morfologia, de modo que, a ativação pró-inflamatória (M1) pode provocar o alongamento celular, enquanto que a ativação anti-inflamatória (M2) podem induzir o formato circular (VOGEL et al., 2014). Diante disso, neste estudo verificou-se a morfologia dos macrófagos controle e infectados por cepa atípica e clonais de *T. gondii*. Nossos resultados mostraram que os macrófagos não infectados (controle) possuíam, em sua maioria, formato circular, sendo esta quantidade também maior quando comparada aos macrófagos infectados por TgChBrUD2 e RH. Enquanto que, a infecção pela cepa atípica TgChBrUD2 produziu maior número de macrófagos com formato fusiforme. Estes macrófagos com forma alongada na infecção por esta cepa atípica também foi maior em relação aos macrófagos fusiformes não infectados. Como a infecção por TgChBrUD2 mostrou características do perfil pró-inflamatório, corrobora com os dados da morfologia celular, já que a ativação pró-inflamatória dos macrófagos induz mudanças no citoesqueleto da célula estimulando os macrófagos a se alongarem (PORCHERAY et al., 2005; ALDRIDGE et al., 2009; VOGEL et al., 2014). Por outro lado, protocolos de maturação e ativação dos macrófagos podem ter efeitos claros sobre a morfologia, provavelmente por afetar arranjos do citoesqueleto. A maturação de macrófagos na presença de M-CSF (fator anti-inflamatório) resultou em macrófagos com formato fusiforme quando comparado com a maturação por GM-CSF (fator pró-inflamatório) que gerou macrófagos arredondados e alongados (VERRECK et al., 2004; WALDO et al., 2008; JAGUIN et al., 2013). Um estudo com macrófagos não tratados e ativados com a citocina anti-inflamatória, IL-10 mostrou predomínio da morfologia circular, enquanto que a maturação de macrófagos na presença de M-CSF ou GM-CSF e ativados por IL-10 mostraram formato tanto circular quanto fusiforme (VOGEL et al., 2014). Tais dados da literatura, podem explicar os resultados da morfologia dos macrófagos infectados por ME49 e RH que não mostraram diferença estatística, apesar dos dados das citocinas, ureia e nitrito terem mostrado que a infecção por estas cepas induziram um perfil do tipo Th1 nos macrófagos.

A ativação com mediadores pró-inflamatórios provoca o aumento da expressão dos marcadores de superfície celular CD40 e CD64, característicos das populações de macrófagos M1, enquanto que a ativação com fatores anti-inflamatórios induz o aumento dos níveis de MR, CD206 e CD163 e indica a polarização para macrófagos M2 (LIU et al., 2013; VOGEL

et al., 2014). Além disso, cepas de *T. gondii* podem induzir a polarização dos macrófagos, de modo que cepas clonais do tipo I e III podem desencadear altos níveis de expressão do receptor CD206 nos macrófagos (JENSEN et al., 2011). Foi observado em um estudo com cepas atípicas chinesas que macrófagos de camundongos infectados com o isolado mais virulento TgCtwh3 regulou positivamente marcadores de macrófagos M2 (CD206, MHC II e PDL-2), enquanto que, o isolado TgCtwh6 (menos virulento) induziu a expressão de marcadores de macrófagos M1 como CD80, PDL-1 e CD86 (LIU, et al., 2013). Nossos dados da expressão dos marcadores de macrófagos M1 (CD64) e macrófagos M2 (CD163 e CD206) por citometria de fluxo mostraram que houve tendência a diminuição do marcador CD64 durante infecção por ambas as cepas (TgChBrUD2, RH e ME49) em relação aos macrófagos controle. Diferentes fatores de maturação e de ativação dos macrófagos podem influenciar a expressão de receptores de superfície celular característicos das subpopulações de macrófagos M1 ou M2, e, desse modo, é importante considerar que, marcadores de macrófagos M1 ou M2 deixam de existir frente a alguns tipos de estímulos (VOGEL et al., 2014). Foi demonstrado que macrófagos maturados com M-CSF (fator anti-inflamatório) e ativados com a citocina IL-4 (citocina característica do tipo Th2) expressaram receptores do tipo M1 (VOGEL et al., 2014). Outro estudo observou que macrófagos estimulados por GM-CSF e M-CSF, fatores que desencadeiam a polarização para M1 ou M2, respectivamente, mostraram resultados inversos, pois os receptores de superfície celular característicos de macrófagos M1 foram expressos durante estímulos anti-inflamatórios (AMBARUS et al., 2012).

Diante desses dados, a polarização desencadeada pelas cepas estudadas no presente estudo pode ser sugerida. Apesar dos dados da citometria de fluxo em relação aos marcadores expressos pelos macrófagos não terem apresentado diferença estatística, os experimentos serão conduzidos para concluir os dados da citometria com os marcadores de macrófagos M1 e M2. É importante considerar que alguns autores afirmam que a polarização dos macrófagos para M1 ou M2 pode ser determinada pela produção de citocinas, sendo IL-12p40, TNF, IL-6 para o tipo M1, e TGF- β e IL-10 para macrófagos M2 (MANTOVANI et al. 2002; DURAFOURT et al. 2012). Além disso, a produção de nitrito é um dos indicadores da ativação clássica (M1), e a atividade de arginase da polarização para o fenótipo M2 (MURRAY; WINN, 2011; MILLS, 2012). Nesse sentido, os resultados da dosagem de citocinas, ureia, nitrito e análise da morfologia celular e proliferação intracelular das cepas de *T. gondii* fornecem bases para identificar a diferenciação fenotípica dos macrófagos. Considerando todos os resultados, as cepas TgChBrUD2 ME49 desencadearam ativação

clássica nos macrófagos provocando polarização para macrófagos M1. A cepa atípica brasileira TgChBrUD2 promoveu resposta pró-inflamatória mais intensa devido a maior produção de mediadores inflamatórios quando comparada com as cepas clonais de *T. gondii* utilizadas no estudo, e se mostrou mais semelhante a resposta desencadeada pela cepa ME49 nos macrófagos do que pela cepa RH. A cepa não clonal foi a que mostrou maiores características do grau de diferenciação para macrófagos M1, diante do aumento das citocinas pró-inflamatórias e nitrito, bem como pelo maior número de macrófagos com formato fusiforme em relação aos macrófagos circulares, além da diminuição de fatores relacionados ao perfil M2 como a regulação para baixo de IL-10 e ureia. Já a infecção pela cepa RH mostrou resposta inflamatória menos intensa do que a provocada por TgChBrUD2 e ME49, e desse modo mostrou menor potencial para a diferenciação para macrófagos M1. Desta forma, o presente estudo contribui para elucidar o comportamento dos macrófagos frente à infecção por cepas clonais e atípica de *T. gondii*, auxiliando no melhor entendimento da polarização de macrófagos humanos durante a toxoplasmose e pode ajudar estudos posteriores de perfis de macrófagos no organismo humano.

6. CONCLUSÕES

A análise de todos os conjuntos de dados permite concluir que:

- Macrófagos infectados por TgChBrUD2, RH e ME49 aumentaram a produção de MIF e diminuíram a liberação de IL-10;
- Macrófagos infectados por TgChBrUD2 aumentaram a produção de IL-6;
- Macrófagos infectados por TgChBrUD2 aumentaram a produção de nitrito;
- Cepa RH apresentou maior capacidade de proliferação intracelular nos macrófagos em comparação com as cepas TgChBrUD2 e ME49;
- Macrófagos infectados por TgChBrUD2 mudaram sua morfologia para o formato fusiforme;
- Macrófagos infectados por TgChBrUD2 e ME49 diminuíram a produção de ureia;
- Os macrófagos infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii* mostraram tendência a diminuição do marcador de macrófago M1.

7. FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*: (A) Seres humanos e animais de sangue quente, funcionando como hospedeiros intermediários, podem adquirir a toxoplasmose ao se infectar com o oocisto maduro (1) encontrado na água, solo, verdura; (2) carne malcozida contendo cisto com bradizoítas ou (3) taquizoítas livres. Durante a fase aguda são encontradas as formas de rápida proliferação (taquizoítas) dentro dos macrófagos (4) ou nas circulações linfática ou sanguínea e na fase crônica, cistos com bradizoítas nos tecidos (5). A gestante poderá transmitir formas de taquizoítas (6) ao feto, através da circulação sanguínea na placenta. B) Um gato jovem ou outros felídeos podem se infectar com qualquer um dos estágios infectantes do parasito, ao ingerir um animal que albergue cistos teciduais com bradizoítas, oocistos maduros do solo, ou macrófagos com taquizoítas; B₁) ocorre a liberação do bradizoíta, esporozoíta ou taquizoíta (8) que penetra na célula epitelial do intestino delgado, onde se inicia a fase assexuada do ciclo, denominada merogonia (9), ocorre individualização por divisão do núcleo e a formação dos merozoítos (10) e a sua liberação para a luz do intestino (11). B₂) os merozoítos liberados penetram em novas células epiteliais e iniciam a fase sexuada do processo denominada gametogonia, dividida em duas partes: o merozoíta, transformado em macrogametócito jovem, inicia a divisão nuclear e após o amadurecimento formam os microgametas flagelados (13). A fusão de um microgameta com um macrogameta origina o zigoto (14) e após a elaboração da membrana cística transforma-se em oocisto imaturo (15). Esse oocisto é liberado nas fezes dos felídeos. C) No solo, o oocisto, por um processo de esporogonia origina os esporozoítos, dentro do oocisto (1), tornando-se infectante aos hospedeiros susceptíveis (REY, 2001).

Figura 1

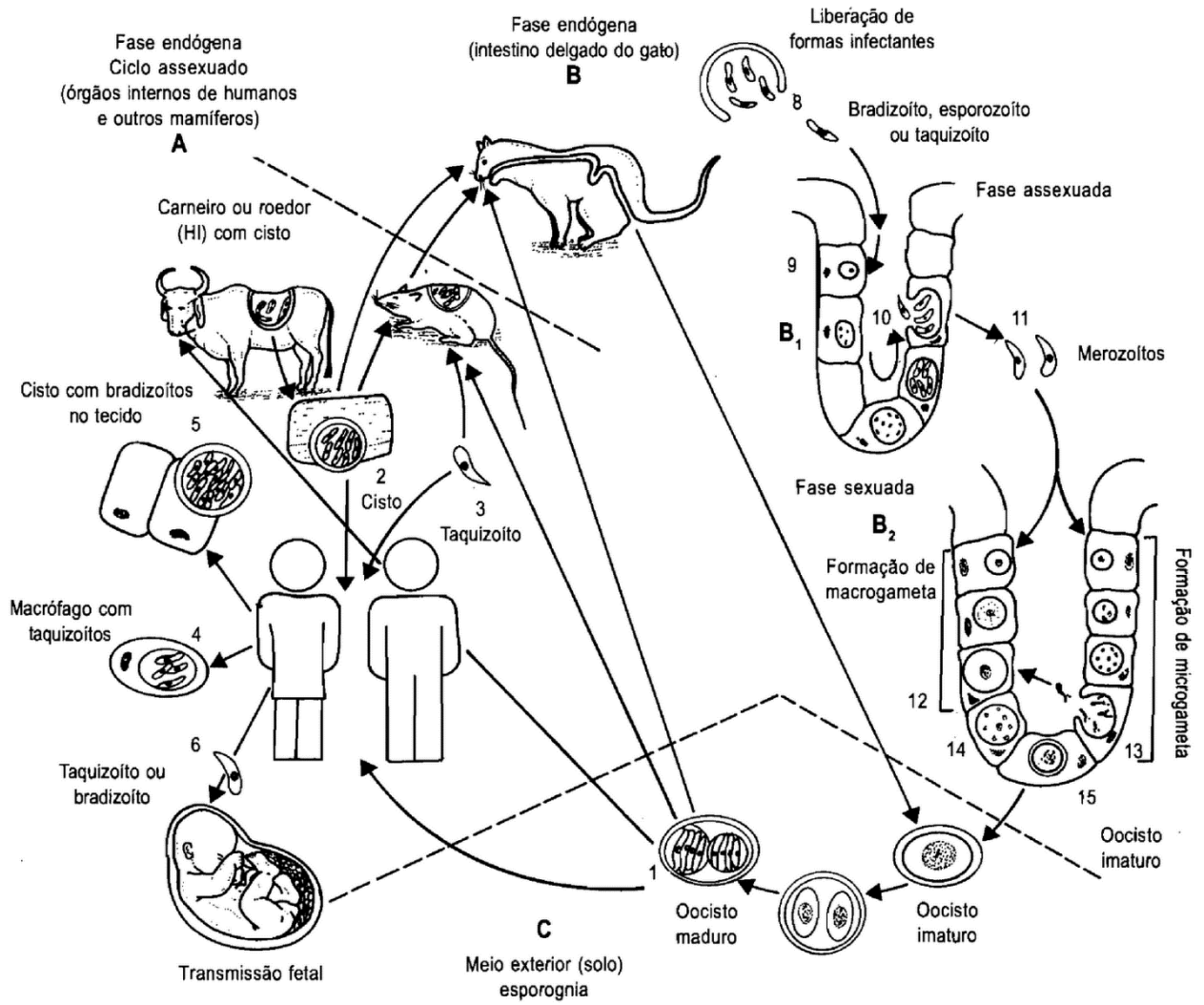


Figura 2: Produção de citocinas por macrófagos infectados ou não pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*. As citocinas IL-10 (A), MIF (B), IL-6 (C), TGF- β 1 (D), TNF (E) e IFN- γ (F) foram mensuradas por ELISA e os resultados expressos em pg/mL. Os dados foram expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) Comparação com o grupo de macrófagos não infectados (teste Bonferroni, $p < 0,05$). (#) Comparação entre condições experimentais diferentes (macrófagos controle, macrófagos infectados por TgChBrUD2, macrófagos infectados por RH, macrófagos infectados por ME49) indicada por linhas conectoras (teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 2

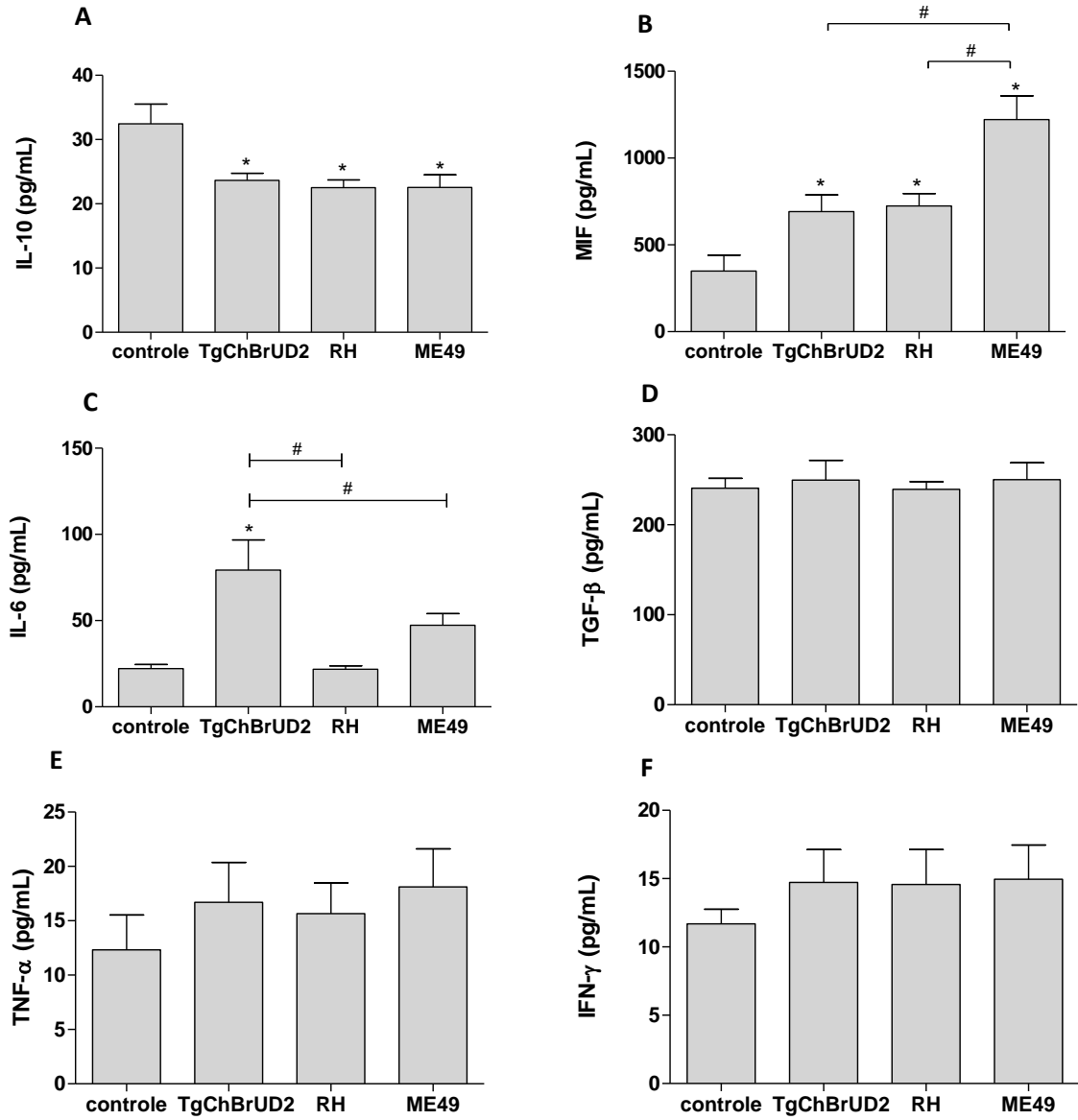


Figura 3A: Produção de ureia por macrófagos infectados ou não pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*. A ureia foi dosada pelo kit UREIA UV Liquiform e os resultados expressos em mg/dL. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) Comparação com o grupo de macrófagos não infectados. * $p < 0,05$ (teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 3B: Produção de nitrito por macrófagos infectados ou não pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*. O nitrito foi mensurado por meio da reação de Griess e os resultados expressos em $\mu\text{M/mL}$. Os dados foram expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) Comparação com o grupo de macrófagos não infectados (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). (#) Comparação entre condições experimentais diferentes (macrófagos controle, macrófagos infectados por TgChBrUD2, macrófagos infectados por RH, macrófagos infectados por ME49) indicada por linhas conectoras (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Figura 3A

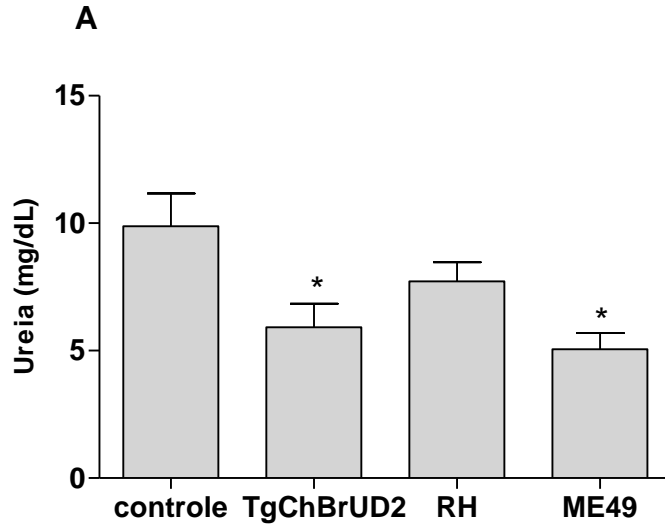


Figura 3B

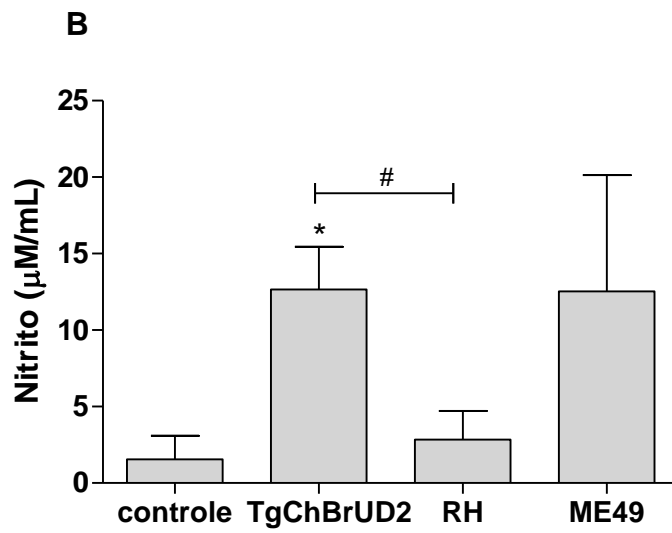


Figura 4: (A) Comparação da carga parasitária nos macrófagos infectados pelas cepas TgChBrUD2, RH ou ME49. A análise foi feita por qRT-PCR e os resultados foram expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (#) Comparação entre condições experimentais diferentes (macrófagos infectados por TgChBrUD2, macrófagos infectados por RH, macrófagos infectados por ME49) indicada por linhas conectoras (teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Fotomicrografias representativas (B) macrófagos infectados por TgChBrUD2, (C) macrófagos infectados por RH e (D) macrófagos infectados por ME49 de um experimento independente realizado em triplicata.

Figura 4

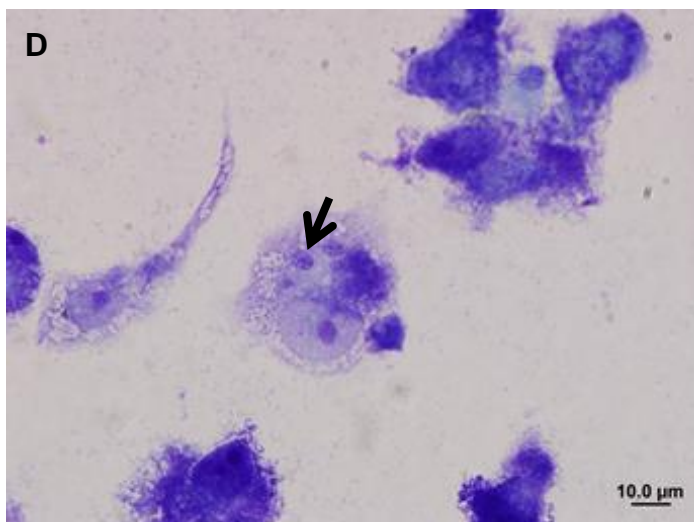
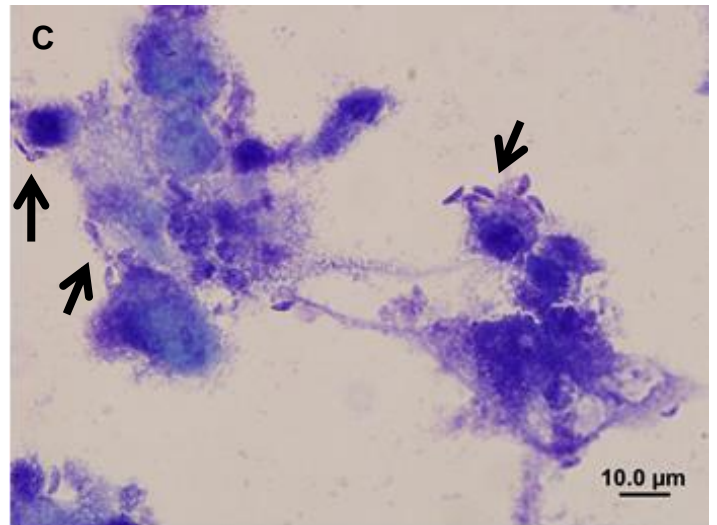
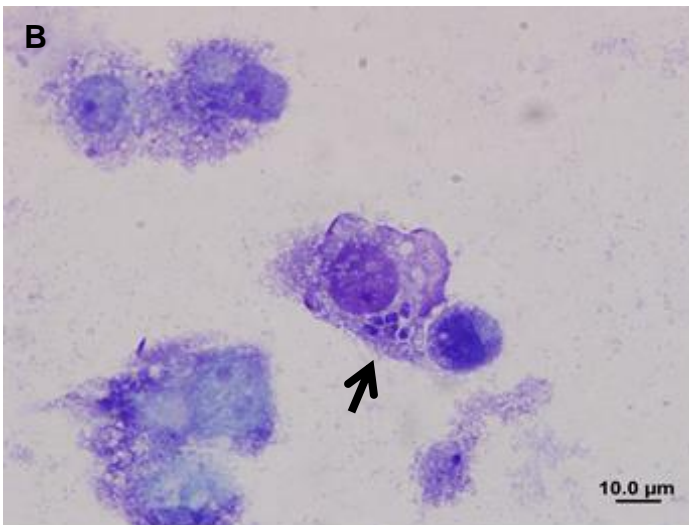
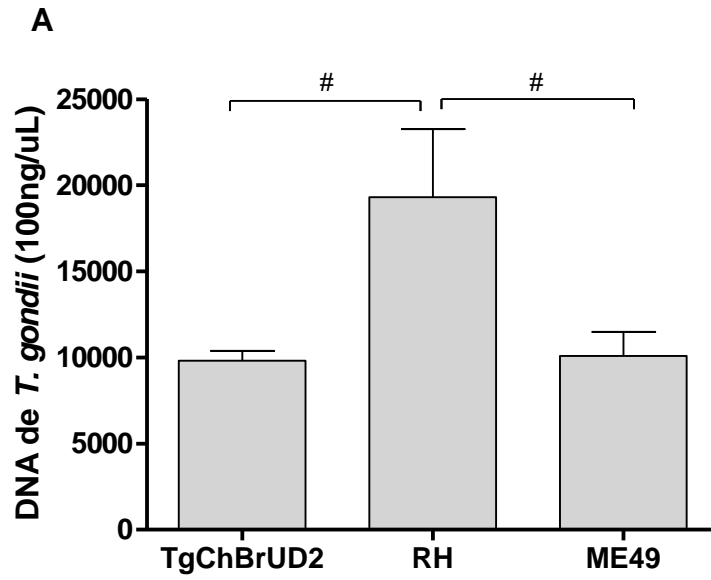


Figura 5: (A) Quantificação de células com formato circular e fusiforme infectadas ou não pelas cepas TgChBrUD2, RH e ME49 de *T. gondii*. (*) Comparação entre grupo de macrófagos de morfologia diferente dentro da mesma condição experimental (teste Dunns, $p < 0,05$). (#, &) Comparação dos macrófagos circulares entre condições experimentais diferentes (macrófagos controle, macrófagos infectados por TgChBrUD2, macrófagos infectados por RH, macrófagos infectados por ME49) indicada por linhas conectoras (teste Dunns, $p < 0,05$). Fotomicrografias representativas (B) de macrófagos controle, (C) macrófagos infectados por TgChBrUD2, (D) macrófagos infectados por RH e (E) macrófagos infectados por ME49.

Figura 5

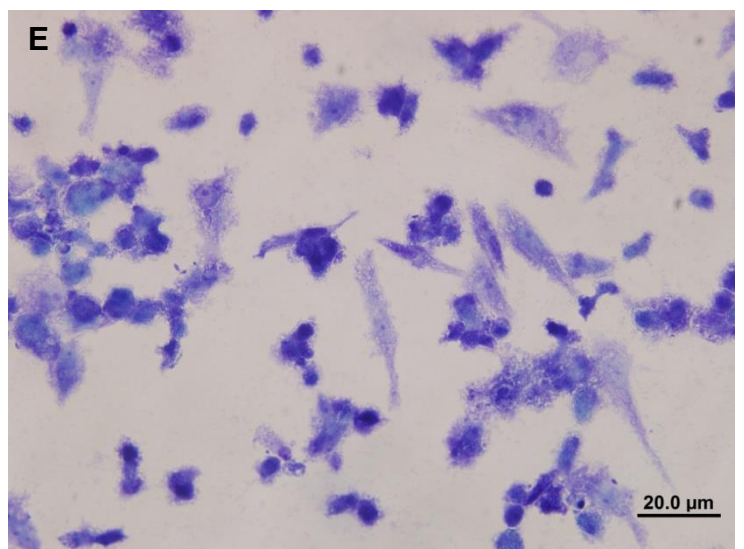
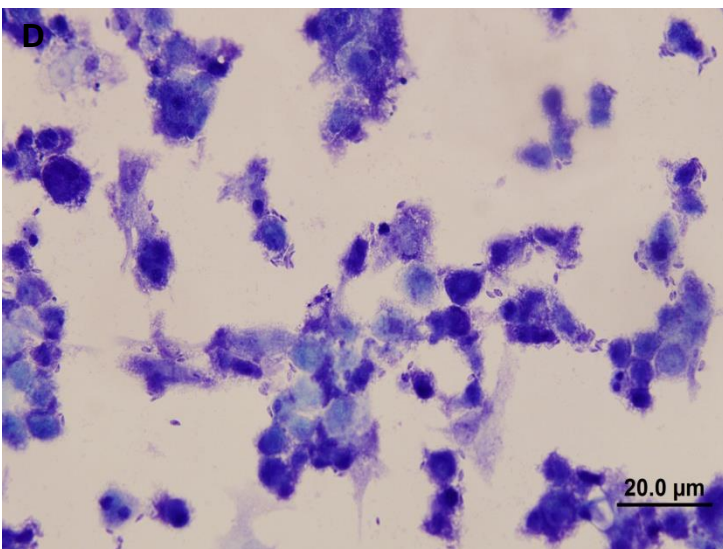
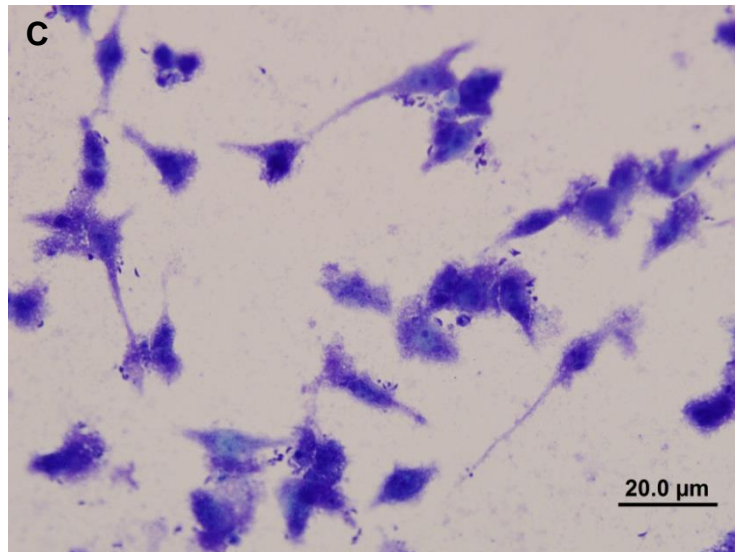
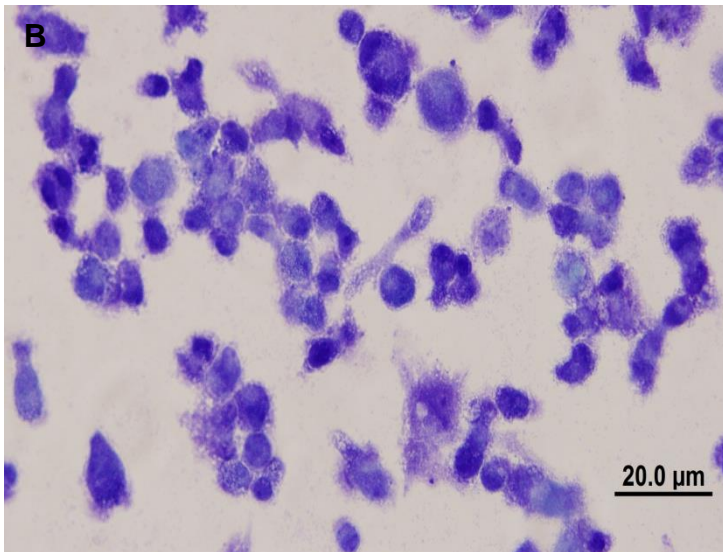
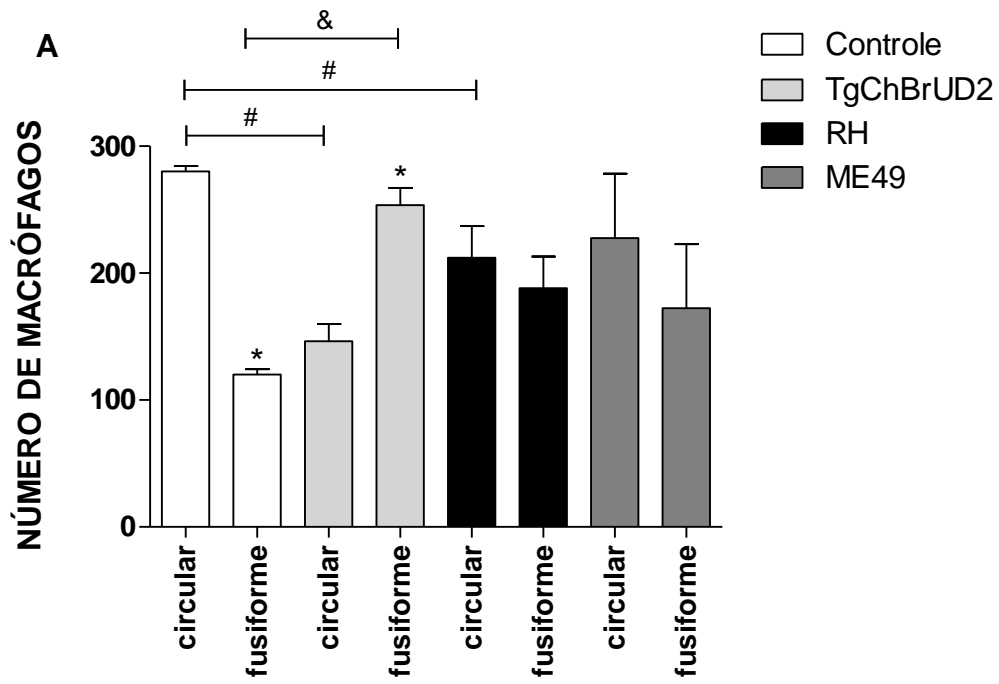
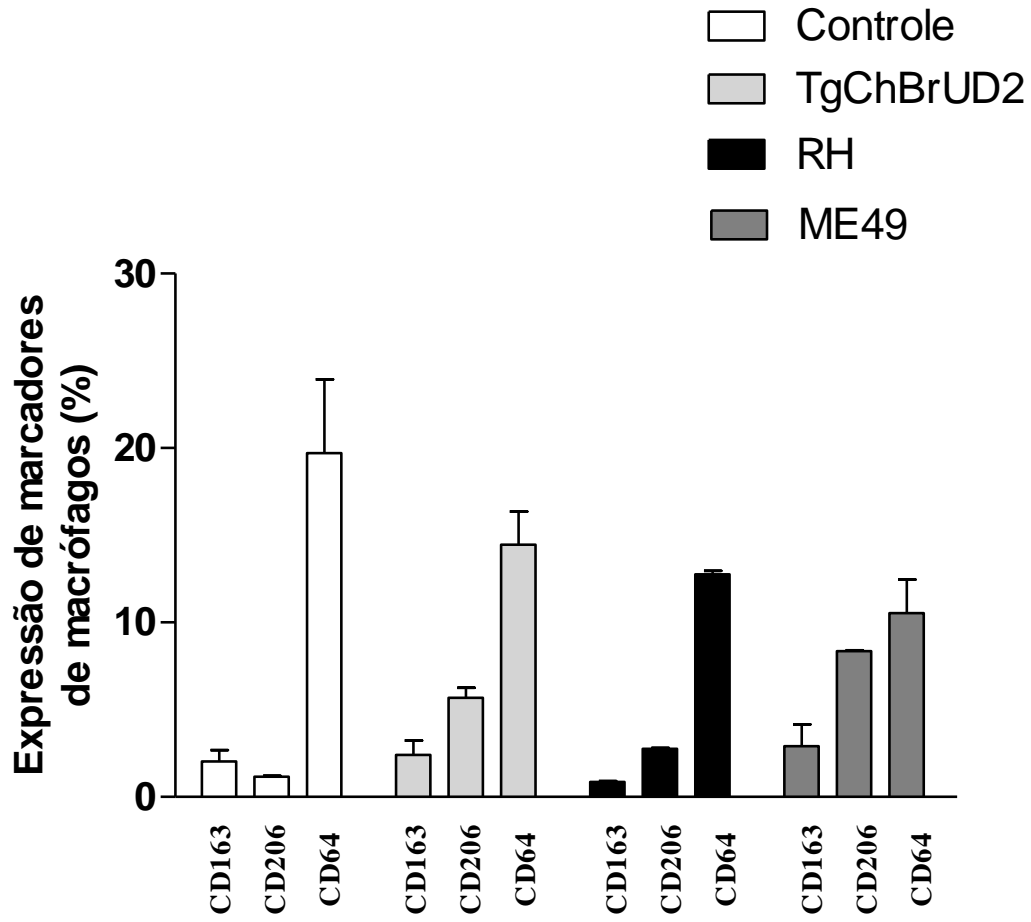


Figura 6: Expressão dos marcadores de superfície celular característicos das populações de macrófagos M1 (CD64) e macrófagos M2 (CD163 e CD206). A análise foi feita por citometria de fluxo. Os dados foram expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Condições experimentais: macrófagos controle, macrófagos infectados por TgChBrUD2, macrófagos infectados por RH, macrófagos infectados por ME49 (teste de Dunns).

Figura 6



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. 566.

ABDALLAHI, O.M.; BENSALEM, H.; AUGIER, R.; DIAGANA, M.; DE REGGI, M.; GHARIB, B. Arginase expression in peritoneal macrophages and increase in circulating polyamine levels in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, n. 9, p. 1350-1357, 2001.

ABDUL-GHANI, R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. **Parasitol Res.**, v. 108, n. 3, p. 505-512, 2011.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENCB, M.; DARDÈ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 27-38, 2002

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMETRÈ, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÈ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 1185–1196, 2004.

ALDRIDGE, J.R.; MOSELEY, C.E.; BOLTZ, D.A.; NEGOVETICH, N.J.; REYNOLDS, C.; FRANKS, J.; BROWN, S.A.; DOHERTY, P.C.; WEBSTER, R.G.; THOMAS, P.G. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 106, n. 13, p. 5306-5311, 2009.

AMBARUS, C. A.; KRAUSZ, S.; EIJK, M.; HAMANN, J.; RADSTAKE, T. R. D. J.; REEDQUIST, K. A.; TAK, P. P.; BAETEN, D. L. P. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. **J. Immunol. Methods**, v. 375, p. 196–206, 2012.

ANGELONI, M.B.; GUIRELLI, P.M.; FRANCO, P.S.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; SILVA, N.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, T.W.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 37, p. 973-82, 2013.

ARNOLD, C.E.; WHYTE, C.S.; GORDON, P.; BARKER, R.N.; REES, A.J.; WILSON, H.M. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function *in vitro* and *in vivo*. **Immunology**, v. 141, n. 1, p. 96-110, 2014.

AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. **Experientia**, v. 47, n. 1, p. 22-31, 1991.

AUWERX, J.; STAELS, B.; VAN VAECK, F.; CEUPPENS, J.L. Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THP-1 monocytic leukemia cells. **Leuk. Res.**, v. 16, n. 3, p. 317-327, 1992.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008.

BARBOSA, B.F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A.O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-62, 2014.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005.

BEHNKE, M.S.; FENTRESS, S.J.; MASHAYEKHI, M.; LI, L.X.; TAYLOR, G.A.; SIBLEY, L.D. The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 11, p. 1-15, 2012.

BENOIT, M.; BARBARAT, B.; BERNARD, A.; OLIVE, D.; MEGE, J.L. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 4, p. 1065-1070, 2008.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. **J Immunol.**, v. 181, n. 6, p. 3733-3739, 2008.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS.**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

BONYADI, M.R.; BASTANI, P. Modification and Evaluation of Avidity IgG Testing for Differentiating of *Toxoplasma gondii* Infection in Early Stage of Pregnancy. **Cell J.**, v. 15, n. 3, p. 238-243, 2013.

CAO, J.; HAN, Z.; TIAN, L.; CHEN, K.; FAN, Y.; YE, B.; HUANG, W.; WANG, C.; HUANG, Z. Curcumin inhibits EMMPRIN and MMP-9 expression through AMPK-MAPK and PKC signaling in PMA induced macrophages. **J Transl Med.**, v. 12, p. 12:266, 2014.

CARELLOS, E.V.; DE ANDRADE, G.M.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; JANUÁRIO, J.N.; ROMANELLI, R.M.; ABREU, M.N.; DA SILVA, F.M.; LOURES, I.R.; DE ANDRADE, J.Q.; CAIAFFA, W.T. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2014.

- CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 83-89, 2006.
- CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2391-402, 2011.
- CASTRO, A.S.; ALVES, C.M.; ANGELONI, M.B.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240-247, 2013.
- CENCI-GOGA, B.T.; ROSSITTO, P.V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C.M.; CULLOR, J.S. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 8, n. 7, p. 751-762, 2011.
- CHANG, C.I.; LIAO, J.C.; KUO, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. H342-348, 1998.
- CHANNON, J.Y.; SEGUIN, R.M.; KASPER, L.H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4822-4826, 2000.
- CHAUDHRY, S.A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Can Fam Physician**, v. 60, n. 4, p. 334-336, 2014.
- CHEN, Q.; DEFRANCES, M.C.; ZARNEGAR, R. Induction of met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. **Cell Growth Differ.**, v. 7, n. 6, p. 821-832, 1996.
- CHEN, F.; KUHN, D.C.; GAYDOS, L.J.; DEMERS, L.M. Induction of nitric oxide and nitric oxide synthase mRNA by silica and lipopolysaccharide in PMA-primed THP-1 cells. **APMIS.**, v. 104, n. 3, p. 176-82, 1996.
- CHEN, Q.; ROSS, A.C. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. **Exp Cell Res.**, v. 297, n. 1, p. 68-81, 2004.
- COERS, J.; STARNBACH, M.N.; HOWARD, J.C. Modeling infectious disease in mice: co-adaptation and the role of host-specific IFN γ responses. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 5, p. 1-5, 2009.
- COMBE, C.L.; CURIEL, T.J.; MORETTO, M.M.; KHAN, I.A. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4913-4921, 2005.
- COMMODARO, A.G.; BELFORT, R.N.; RIZZO, L.V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; BURNIER, Jr. M.N.; BELFORT, Jr. R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n.2, p. 345-350, 2009.

COOK, H.T.; JANSEN, A.; LEWIS, S; LARGEN, P.; O'DONNELL, M.; REAVELEY, D.; CATTELL, V. Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: interaction between nitric oxide synthase and arginase. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. 646-653, 1994.

DABRITZ, H.A.; CONRAD, P.A. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 34-52, 2010.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J.A.; MARRIOTT, H.M.; WHYTE, M.K.; DOCKRELL, D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2010.

DARDÉ, M.L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 366-371, 2008.

DENKERS, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, n. 737125, p. 1-7, 2010.

DENNEY, J.M.; NELSON, E.L.; WADHWA, P.D.; WATERS, T.P.; MATHEW, L.; CHUNG, E.K.; GOLDENBERG, R.L.; CULHANE, J.F. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 170-107, 2011.

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

DUBEY, J.P.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.; FRENKEL, J.K. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. **J Parasitol.**, v. 85, n. 4, p. 657-662, 1999.

DUBEY, J. P.; GENARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; VIANNA, M. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free range chickens from Amazon, Brazil. **J. Parasitol.**, v. 92, n. 1, p. 36-40, 2006a.

DUBEY, J. P.; SU, C.; OLIVEIRA, J.; MORALES, J. A.; BOLAÑOS; SUNDAR, N.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free range chickens from Costa Rica, Central America. **Vet. Parasitol.**, v. 139, p. 29-36, 2006b.

DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J.P; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190-195, 2009.

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. **Int J Parasitol.**, v. 41, n. 11, p. 1139-1147, 2011.

DUBEY, J.P.; LAGO, E.G.; GENNARI, S.M.; SU, C.; JONES, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, V. 139, N. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUPONT, C.D.; CHRISTIAN, D.A.; HUNTER, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012.

DURAFOURT, B.A.; MOORE, C.S.; ZAMMIT, D.A.; JOHNSON, T.A.; ZAGUIA, F.; GUIOT, M.C.; BAR-OR, A.; ANTEL, J.P. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. **Glia**, v. 60, n. 5, p. 717-727, 2012.

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health.**, v. 122, n. 4, p. 335-353, 2008.

FAVORETO-JÚNIOR, S.; FERRO, E.A.; CLEMENTE, D.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 103-7, 1998.

FERGUSON, D. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 8, p. 351, 2002.

FERRO, E.A.; SILVA, D.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect Immun.**, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann. Ist. Super Sanità.**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FLEETWOOD, A. J.; LAWRENCE, T.; HAMILTON, J. A.; COOK, A. D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for csf blockade in inflammation. **J. Immunol.**, v. 78, p. 5245-5252, 2007.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENÓRIO, E. P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUAREZ, I.; SATOSKAR, A. A.; SHENOY, A. S.; TERRAZAS, L. I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. R. RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.**, v. 22, nº 10, p. 1-11, 2008.

FRANCO, P. S.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, nº 11, p. 838-844, 2011.

FRANCO, P.S.; RIBEIRO, M.; LOPES-MARIA, J.B.; COSTA, L.F.; SILVA, D.A.; DE FREITAS BARBOSA, B.; DE OLIVEIRA GOMES, A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. **Parasitol. Res.**, v. 113, n. 7, p. 2655-2664, 2014.

FRANCO, P.S.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; IETTA, F.; SHWAB, E.K.; SU, C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 181, p. 1-13, 2015.

GAZZINELLI, R.T.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J. Immunol.**, v. 151, n. 7, p. 3672-3681, 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*. **J. Immunol.**, v. 153, n. 6, p. 2533-2543, 1994.

GILBERT, R.E.; FREEMAN, K.; LAGO, E.G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; TAN, H.K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M.R.; PETERSEN, E. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

GOERDT, S.; ORFANOS, C. E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 10, p. 137-142, 1999.

GOMES, A. O.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU, L. R.; SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. **Am. J. Pathol.**, v. 178, n° 6, p. 2792-2801, 2011.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOVSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUDE, N.M.; ROBERTS, C.T.; KALIONIS, B.; KING, R.G. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb Res.**, v. 114, n. 5-6, p. 397-407, 2004.

GUIRELLI, P.M.; ANGELONI, M.B.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; CASTRO, A.S.; FRANCO, P.S.; SILVA, R.J.; OLIVEIRA, J.G.; MARTINS-FILHO, O.A.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; FERRO, E.A. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 36, n. 10, p. 1106-1114, 2015.

HAUSER, W.E., SHARMA S.D.; REMINGTON, J.S. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 131, n. 1, p. 458-63, 1983.

- HEIMESAAT, M.M.; FISCHER, A.; JAHN, H.K.; NIEBERGALL, J.; FREUDENBERG, M.; BLAUT, M.; LIESENFELD, O.; SCHUMANN, R.R.; GÖBEL, U.B.; BERESWILL, S. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. **Gut**, v. 56, n. 7, p. 941-948, 2007.
- HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect.**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.
- HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.
- HILL, D.E.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. **Int J Parasitol.**, v. 43, n. 2, p. 107-113, 2013.
- HJORT, M.R.; BRENYO, A.J.; FINKELSTEIN, J.N.; FRAMPTON, M.W.; LOMONACO, M.B.; STEWART, J.C.; JOHNSTON, C.J.; D'ANGIO, C.T. Alveolar epithelial cell-macrophage interactions affect oxygen-stimulated interleukin-8 release. **Inflammation**, v. 27, n. 3, p. 137-145, 2003.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect. Dis.**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.
- 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 Pathog.**, v. 2, n. 2, p. e13, 2006.
- HUMENIUK-POLACZEK, R.; MARCINKOWSKA, E. Impaired nuclear localization of vitamin D receptor in leukemia cells resistant to calcitriol-induced differentiation. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 88, n. 4-5, p. 361-366, 2004.
- HUNTER, C. A.; CANDOLFI, E.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunology**, v. 84, n. 1, p. 16-20, 1995.
- HUNTER, C.A., SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol.**, v. 10, p. 766-778, 2012.
- IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 271, n. 3, p. 559-564, 2000.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Front Immunol.**, v. 5, n. 514, p. 1-22, 2014.
- ITALIANI, P.; MAZZA, EM.; LUCCHESI, D.; CIFOLA, I.; GEMELLI, C.; GRANDE, A.; BATTAGLIA, C.; BICCIATO, S.; BORASCHI, D. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes *in vitro*. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 1-12, 2014.
- JAGUIN, M.; HOULBERT, N.; FARDEL, O.; LECUREUR, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically

- activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. **Cell Immunol.**, v. 281, n. 1, p. 51-61, 2013.
- JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.
- JENSEN, K.D.; WANG, Y.; WOJNO, E.D.; SHASTRI, A.J.; HU, K.; CORNEL, L.; BOEDEEC, 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. 1-22, 2011.
- JOHH, B.; WENINGER, W.; HUNTER, C. A. Advances in imaging the innate and adaptive immune response to *Toxoplasma gondii*. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 1321-1328, 2010.
- JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 6, p.845-851, 2012.
- JONGERT, E.; LEMIERE, A.; VAN GINDERACHTER, J.; DE CRAEYE, S.; HUYGEN, K.; D'SOUZA, S. Functional characterization of *in vivo* effector CD4(+) and CD8(+) T cell responses in acute Toxoplasmosis: an interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells. **Vaccine**, v. 28, n. 13, p. 2556-2564, 2010.
- KAUFMAN, H.E., REMINGTON, J.S., JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 46, p. 255-260, 1958.
- KAWAZOE, U. **Kawazoe U.** 11. São Paulo: Atheneu, 2005.
- KHAN, I.A.; SCHWARTZMAN, J.D.; MATSUURA, T.; KASPER, L.H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 25, p. 13955-13960, 1997.
- KHAN, A.; TAYLOR, S.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. **PLoS Genet.**, v. 5, n. 3, p. e1000404, 2009.
- KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU, C.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011
- KIM, L.; BUTCHER, B.A.; LEE, CW.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. **J. Immunol.**, v. 177, n. 4, p. 2584-2591, 2006.
- KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **J. Fr. Ophthalmol.**, v. 33, n. 5, p. 362-367, 2010.
- KIM, K.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004

KOMPALIC-CRISTO, A.; FROTTA, C.; SUÁREZ-MUTIS, M.; FERNANDES, O.; BRITTO, C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitol Res.**, v. 101, n. 3, p. 619-625, 2007.

KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **APMIS.**, v. 118, n. 8, p. 529-542, 2010.

KRAMER, P.R.; WRAY, S. 17-Beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 81, n. 3, p. 203-216, 2002.

LANG, C.; GROB, U.; LUDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptative immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, v. 100, n. 2, p. 191-203, 2007.

LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J.S.; SUZUKI, Y. Association of CD4⁺ T cell-dependent, interferongamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 597–607, 1996.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1829-1831, 2011.

LIU, Y.; STEWART, K.N.; BISHOP, E.; MAREK, C.J.; KLUTH, D.C.; REES, A.J.; WILSON, H.M. Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 180, n. 9, p. 6270-6278, 2008.

LIU, T.; ZHANG, Q.; LIU, L.; XU, X.; CHEN, H.; WANG, H.; KONG, L.; WANG, W.; ZHANG, A.; CAI, Y.; LI, M.; YU, L.; DU, J.; WANG, X.; LUO, Q.; LUN, Z.R.; WANG, Y.; SHEN, J. Trophoblast apoptosis through polarization of macrophages induced by Chinese *Toxoplasma gondii* isolates with different virulence in pregnant mice. **Parasitol. Res.**, v. 112, p. 3019–3027, 2013.

LOPES, C.S.; FRANCO, O.S.; SILVA, N.M.; SILVA, D.A.; FERRO, E.A.; PENA, H.F.; SOARES, R.M.; GENNARI, S.M.; MINEO, J.R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiol Infect.**, v. 8, p. 1-11, 2016.

LUDER, C.G.; STANWAY, R.R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V.T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 2, p. 163-173, 2009.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 677–686, 2004.

MANTOVANI, A.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; LOCATELLI, M.; BISWAS, S.K. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 9, p. 2522-2525, 2011.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. **J. Pathol.**, v. 229, p. 176-185, 2013.

MARTINEZ, F.O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.*, v. 6, p. 1-13, 2014.

MCCORMICK, SM.; HELLER, N.M. Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. **Front Immunol.**, v. 6, n. 549, p. 1-19, 2015.

MCLEOD, R.; BOYER, K.M.; LEE, D.; MUI, E.; WROBLEWSKI, K.; KARRISON, T.; NOBLE, A.G.; WITHERS, S.; SWISHER, C.N.; HEYDEMANN, P.T.; SAUTTER, M.; BABIARZ, J.; RABIAH, P.; MEIER, P.; GRIGG, M.E. Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 11, p. 1595-605, 2012.

MELO, M.B.; JENSEN K.D.; SAEIJ J.P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011.

MELO, M.B.; NGUYEN, Q.P.; CORDEIRO, C.; HASSAN, M.A.; YANG, N.; MCKELL, R.; ROSOWSKI, E.E.; JULIEN, L.; BUTTY, V.; DARDÉ, M.L.; AJZENBERG, D.; FITZGERALD, K.; YOUNG, L.H.; SAEIJ, J.P. Transcriptional analysis of murine macrophages infected with different *Toxoplasma* strains identifies novel regulation of host signaling pathways. **PLoS Pathog.**, v. 9, p. 1-17, 2013.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; IKIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MILLS, C.D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 32, n. 6, p. 463-488, 2012.

MINNS, L. A.; MENARD, L. C.; FOUREAU, D. M.; DARCHE, S.; RNET, C.; MIELCARZ, D. W.; BUZONI-GATEL, D.; KASPER, L. H. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 176, n. 12, p. 7589-7597, 2006.

MINOT, S.; MELO, M.B.; LI, F.; LU, D.; NIEDELMAN, W.; LEVINE, S.S.; SAEIJ, J.P. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 33, p. 13458-13463, 2012.

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

MORDUE, D.G.; MONROY, F.; REGINA, M.L.; DINARELLO, C.A.; SIBLEY, L.D. Acute toxoplasmosis to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J. Immunol.**, v. 167, n. 8, p. 4574-4584, 2001.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J. Leukocyte Biol.**, v. 73, p. 209–212, 2003.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M.M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev.**, v. 240, n. 1, p. 269-285, 2011.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. **J. Leukoc. Biol.**, v. 89, n. 4, p. 557-63, 2011.

NAGAMUNE, K.; SIBLEY, L. D. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 8, p. 1613-1627, 2006.

O'SHEA, J.J.; PAUL, W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science**, v. 327, n. 5969, p. 1098-1102, 2010.

OPSTEEGH, M.; KORTBEEK, T.M.; HAVELAAR, A.H.; VAN DER GIESSEN, J.W. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clin Infect Dis.**, v. 60, n. 1, p. 101-107, 2015.

PARK, E.K.; JUNG, H.S.; YANG, H.I.; YOO, M.C.; KIM, C.; KIM, K.S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflamm Res.**, v.56, p. 45-50, 2007.

PATHAK, S.K.; BASU, S.; BASU, K.K.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; BHATTACHARYYA, A.; KAISHO, T.; KUNDU, M.; BASU, J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nat Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 610-8, 2007.

PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENG, H.J; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **J Parasitol.**, v. 97, n. 4, p. 620-628, 2011.

PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; MENTINK-KANE, M.M.; WILSON, M.S.; EL KASMI, K.C.; SMITH, A.M.; THOMPSON, R.W.; CHEEVER, A.W.; MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 4, p. 1-15, 2009.

POLLARD, A. M.; ONATOLU, K. N.; HILLER, L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 1, p. 103-110, 2008.

PORCHERAY, F.; VIAUD, S.; RIMANIOL, A.C.; LÉONE, C.; SAMAH, B.; DEREUDDRE-BOSQUET, N.; DORMONT, D.; GRAS, G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.*, v. 142, n. 3, p. 481-489, 2005.

QIN, H.; HOLDBROOKS, A.T.; LIU, Y.; REYNOLDS, S.L.; YANAGISAWA, L.L.; BENVENISTE, E.N. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. **J. Immunol.**, v. 189, n. 7, p. 3439-3448, 2012.

RATH, M.; MÜLLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E.I.; MUNDER, M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Front Immunol.**, v. 5, n. 532, p. 1-10, 2014.

REESE, M.L.; SHAH, N.; BOOTHROYD, J.C. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 is an allosteric inhibitor of the immunity-related GTPases. **J Biol Chem.**, v. 289, n. 40, p. 27849-58, 2014.

REY, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: (Ed.). **Parasitologia**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 321-334.

REYES, L.; DAVIDSON, M.K.; THOMAS L.C.; DAVIS, J.K. Effects of *Mycoplasma fermentans* incognitus on differentiation of THP-1 cells. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 7, p. 3188-3192, 1999.

RIBEIRO, M. Ação de azitromicina, espiramicina e da associação de sulfadiazine e pirimetamina na infecção por cepas atípicas (Udi1-CH05 e Udi2-CH05) de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) -, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2013. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

ROBBEN, P.M.; MORDUE, D.G.; TRUSCOTT, S.M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L.D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **J. Immunol.**, v. 172, n. 6, p. 3686-3694, 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **J. Infect.**, v. 68, n. 1, p. S125-133, 2014.

ROBERTS, C.W.; CRUICKSHANK, S.M.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 7, p. 2549-2555, 1995.

ROBERTS, S.C.; TANCER, M.J.; POLINSKY, M.R.; GIBSON, K.M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004.

- ROSOWSKI, E.E.; LU, D.; JULIEN, L.; RODDA, L.; GAISER, R.A.; JENSEN, K.D.; SAEIJ, J.P. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **J. Exp. Med.**, v. 108, n. 1, p. 195-212, 2011.
- SAEIJ, J.P.; COLLER, 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.
- SALAMONE, G.; FRACCAROLI, L.; GORI, S.; GRASSO, E.; PAPANINI, D.; GEFFNER, J.; PÉREZ LEIRÓS, C.; RAMHORST, R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. **Hum. Reprod.**, v. 27, n. 9, p. 2598-2606, 2012.
- SANDERSON, I. R.; WALKER, W. A. TLRs in the gut I. The role of TLRs/Nods in intestinal development and homeostasis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 292, n. 1, p. G6-10, 2007.
- SANECKA, A.; FRICKEL, E. M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 678-689, 2012.
- SANTOS, C.D.; TOLDO, M.P.; LEVY, A.M.; PRADO, J.C. JR. *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in *Calomys callosus* a natural reservoir of infection. **Exp Parasitol.**, v. 119, n. 2, p. 197-201, 2008.
- SAUER, A.; DE LA TORRE, A.; GOMEZ-MARIN, J.; BOURCIER, T.; GARWEG, J.; SPEEG-SCHATZ, C.; CANDOLFI, E. Prevention of retinochoroiditis in congenital toxoplasmosis: Europe versus South America. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 30, n. 7, p. 601-603, 2011.
- SCANGA, C. A.; AILBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance of *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 12, p. 5997-6001, 2002.
- SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.
- SCHLÜTER D; DÄUBENER, W; SCHARES, G; GROß, U; PLEYER, U; LÜDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.
- SCHNEEMANN, M.; SCHOEDEN, G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. **J. Leukoc. Biol.**, v. 81, n.3, p. 579, 2007.
- SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C.; GÓMEZ-MARIN, J.E.; BOBIĆ, B.; NARANJO-GALVIS, C.A.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Med Infect Dis.**, v. 12, p. 592-601, 2014.

- SHEINER, L.; SANTOS, J.M.; KLAGES, N.; PARUSSINI, F.; JEMMELY, N.; FRIEDRICH, N.; WARD, G.E.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. **Mol Microbiol.**, v. 77, n. 4, p. 912-929, 2010.
- SCHLÜTER, D.; DÄUBENER, W.; SCHARES, G.; GROß, U.; PLEYER, U.; LÜDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int J Med Microbiol.**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.
- SHWAB, E.K.; ZHU, X.Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453-461, 2014
- SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 329-351, 2008.
- SIBLEY, L.D., KHAN, A., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.
- SIBLEY, L.D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Rev.**, v. 240, n. 1, p. 72-91, 2011.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 3, p. 787-95, 2012.
- SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol. Res.**, v. 105, n. 4, p. 893-898, 2009.
- SILVA, C. V.; CRUZ, L.; ARAUJO, N. S.; ANGELONI, M. B.; FONSECA, B. B.; GOMES, A. O.; CARVALHO, F. R.; GONÇALVES, A. L. R.; BARBOSA, B. F. A glance at *Listeria* and *Salmonella* cell invasion: different strategies to promote host actin polymerization. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 302, n. 1, p. 19-32, 2012.
- SINDRILARU, A. et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 3, p. 985-997, 2011.
- SKARIAH, S.; McINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol. Res.**, v. 107, n. 2, p. 253-260, 2010.
- SOUZA, W.; DUARTE, E. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTÍAS, M., VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- STAJNER, T.; VASILJEVIĆ, Z.; VUJIĆ, D.; MARKOVIĆ, M.; RISTIĆ, G.; MIĆIĆ, D.; PASIĆ, S.; IVOVIĆ, V.; AJZENBERG, D.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 8, p. 2686-90, 2013.

- STEINFELDT, T.; KÖNEN-WAISMAN, S.; TONG, L.; PAWLOWSKI, N.; LAMKEMEYER, T.; SIBLEY, L.D.; HUNN, J.P.; HOWARD, J.C. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS Biol.**, v. 8, n. 12, p. e1000576, 2010.
- STEMPIN, C. C.; DULGERIAN, L. R.; GARRIDO, V. V.; CERBAN, F. M. Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. **J. Biomed. Biotechnol.**, p. 1-10, 2010.
- STRAUB, K.; CHENG, S.; SOHN, C.; BRADLEY, P. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 590-603, 2009.
- STURGER, C. R.; YAROVINSKY, F. complex Immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 8, p. 3090-3097, 2014.
- 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.
- SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **PNAS**, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, 2012.
- SULLIVAN, W.J. JR.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, n. 3, p. 717-733, 2012.
- 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.
- SVENSSON-ARVELUND, J., ERNERUDH, J. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. **Am. J. Reprod. Immunol.**, 2015.
- TALABANI, H.; MERGEY, T.; YEAR, H.; DELAIR, E.; BRÉZIN, A.P.; LANGSLEY, G.; DUPOUY-CAMET, J. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. **Parasite**, v. 17, n. 3, p. 177-82, 2010.
- TAYLOR, G.A.; COLLAZO, C.M.; YAP, G.S.; NGUYEN, K.; GREGORIO, T.A.; TAYLOR, L.S.; EAGLESON, B.; SECREST, L.; SOUTHON, E.A.; REID, S.W.; TESSAROLLO, L.; BRAY, M.; MCVICAR, D.W.; KOMSCHLIES, K.L.; YOUNG, H.A.; BIRON, C.A.; SHER, A.; VANDE WOUDE, G.F. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 2, p. 751-755, 2000.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TERRAZAS, C. A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L. I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E. A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Exp. Parasitol.**, v. 126, n° 3, p. 348-358, 2010.

THIÉBAUT, R.; LEPROUST, S.; CHÊNE, G.; GILBERT, R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **Lancet**, v. 369, n. 9556, p. 115-122, 2007.

TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. **Trends Parasitol.**, v. 29, n. 8, p. 380-384, 2013.

TSUCHIYA, S.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, Y.; OKUMURA, H.; NAKAE, S.; KONNO, T.; TADA, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. **Cancer Res.**, v. 42, n. 4, p. 1530-1536, 1982.

UEKI, K.; TABETA, K.; YOSHIE, H.; YAMAZAKI, K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. **Clin Exp Immunol.**, v. 127, n. 1, p. 72-77, 2002.

UNNO, A.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitol. Int.**, v. 57, n. 4, p. 515-518, 2008.

VALLOCHI, A.L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. JR.; RIZZO, L.V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J.A.; DE LEÓN-NAVA, M.A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 114-121, 2009.

VERRECK, F.A.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D.M.; HOEVE, M.A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T.H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 13, p. 4560-4565, 2004.

VOGEL, D. Y. S.; GLIM, J. E.; STAVENUITER, A. W. D.; BREUR, M.; HEIJNEN, P.; AMOR, S.; DIJSTRA, C. D.; BEELEN, R. H. J. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**, v. 51146, p. 1-9, 2014.

Wahab T1, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 591-592, 2010.

WALDO, S.W.; LI, Y.; BUONO, C.; ZHAO, B.; BILLINGS, E.M.; CHANG, J.; KRUTH, H.S. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. **Am J Pathol.**, v. 172, n. 4, p. 1112-1126, 2008.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Front. Immunol.**, v. 5, n. 614, p. 1-9, 2014.

YAN, X.; JI, Y.; LIU, X.; SUO, X. Nitric oxide stimulates early egress of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from Human foreskin fibroblast cells. **Parasit. Vectors**, v. 8, p. 1-6, 2015.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 14, n. 2, p. 109-121, 2014.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 454-465, 2007.

ZHANG, A.M.; SHEN, Q.; LI, M.; XU, X.C.; CHEN, H.; CAI, Y.H.; LUO, Q.L.; CHU, D.Y.; YU, L.; DU, J.; LUN, Z.R.; WANG, Y.; SHA, Q.; SHEN, J.L. Comparative studies of macrophage-biased responses in mice to infection with *Toxoplasma gondii* ToxoDB #9 strains of different virulence isolated from China. **Parasit. Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2013.

ZHAO, Y.O.; ROHDE, C.; LILUE, J.T.; KÖNEN-WAISMAN, S.; KHAMINETS, A.; HUNN, J.P.; HOWARD, J.C. *Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 234-240, 2009.

ZHOU, X. W.; KAFSACK, B. F. C.; COLE, R. N.; BECKETT, P.; SHEN, R. F.; CARRUTHERS, V. B. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34233-34244, 2005.

ZHOU, D.H.; YUAN, Z.G.; ZHAO, F.R.; LI, H.L.; ZHOU, Y.; LIN, R.Q.; ZOU, F.C.; SONG, H.Q.; XU, M.J.; ZHU, X.Q. Modulation of mouse macrophage proteome induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vivo. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 1637-1646, 2011.

ANEXO

ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 101/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 049/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus* cronicamente infectados pela cepa ME-49 e reinfectedos com isolados Udi-1 CH-05 e Udi-2CH-05".

Pesquisador Responsável: Eloisa Amália Vieira Ferro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de julho de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU