

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

Danielle Reis Napolitano

**Resposta de macrófagos murinos à infecção por
Toxoplasma gondii sob a influência de frações
hidrofóbicas do parasito e de *Serjania lethalis***

Uberlândia

2005

SISBI/UFU



1000220842

Danielle Reis Napolitano

NOV
616.993.1
02162
TES/MEU

**Resposta de macrófagos murinos à infecção por
Toxoplasma gondii sob a influência de frações
hidrofóbicas do parasito e de *Serjania lethalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Doutor em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto Mineo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Uberlândia

2005

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Roberto Mineo, não só pela orientação, mas também por todos os ensinamentos e a força para seguir sempre em frente, apesar das tantas dificuldades.

Ao meu co-orientador, Dr. Foued Salmen Espindola, por todo o trabalho desenvolvido com os extratos de plantas e à Dr. Laila Salmen Espindola, da Universidade de Brasília pelos extratos fornecidos.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Imunologia de Universidade Federal de Uberlândia, pela convivência e pelos trabalhos que realizamos juntos.

Ao Prof. Dr. Igor Correia de Almeida do Laboratório de Glicobiologia do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, pelos experimentos realizados em seu laboratório.

Ao Dr. Mike Ferguson e sua esposa Dr. Maria Lúcia Güther do "Department of Biochemistry", "University of Dundee", UK, pelas sugestões.

Às instituições CAPES, CNPq pelo apoio financeiro e a Genentech (São Francisco, CA, USA) pelo fornecimento de anticorpos anti-TLR2.

Aos meus pais, meus familiares e ao meu marido por todos os momentos importantes de minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

GIPL: glicoinositolfosfolípides

GPI: glicofosfatidilinositol

GM1, GD1a, GD1b e GT1b: mono, di e tri-sialotetraesoxilgangliosídeos

IFN- γ : interferon- γ

LPS: lipopolissacáride

MGLs: "macrophage galactose (Gal)-type C-type lectin"

MTT: "3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (blue tetrazolium)"

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

PBS: tampão fosfato salino 0,15 M, pH 7,2

RPMIc: meio RPMI completo

SBF: soro bovino fetal

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras na presença de dodecil sulfato de sódio

TGF- β : "transforming growth factor- β "

TLC: "thin layer chromatography"

TLR: "toll like receptor"

TNF- α : "tumor necrosis factor- α "

RESUMO

Os macrófagos desempenham um papel importante na defesa contra agentes infecciosos tanto durante a imunidade inata quanto adaptativa. Estas células são ativadas por diferentes componentes microbianos para liberação de citocinas e óxido nítrico (NO), um importante agente microbicida. Entretanto, os macrófagos também funcionam como células hospedeiras para *Toxoplasma gondii*, que desenvolveram estratégias eficientes para a sobrevivência intracelular. Neste trabalho, componentes da membrana do parasito foram extraídos e estes utilizados para avaliar a resposta de macrófagos frente ao parasito. O tratamento destas células com frações hidrofóbicas de taquizoítos de *T. gondii* estimularam diferentes perfis de produção de NO em macrófagos J774 e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c. Além disso, macrófagos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii*, após o tratamento *in vitro*, com as frações e com um extrato etanólico de *Serjania lethalis*, uma planta com propriedade anti-inflamatória. Das três células estudadas, os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c apresentaram maior porcentagem de infecção, que foi inibida por tratamento com uma das frações (F0). O tratamento com extrato de *Serjania lethalis* reduziu a produção de NO por células estimuladas com LPS e IFN- γ e inibiu a infecção por *T. gondii*. Estes resultados mostram, em primeiro lugar, que macrófagos provenientes de linhagens diferentes de camundongos apresentam susceptibilidade diferente à infecção pelo parasito. Em segundo lugar, a extração de componentes altamente hidrofóbicos de taquizoítos de *T. gondii* permite a obtenção de um material rico em moléculas bioativas capazes de interferir na interação parasito-célula hospedeira. E por último, a ativação de macrófagos para liberação de NO pode ser regulada, a fim de se evitar os danos causados por uma resposta inflamatória exacerbada.

ABSTRACT

Macrophages play an important role in defense against infectious agents, during innate or adaptive immunity. They are activated by different microbial components and release cytokines and nitric oxide (NO), an important microbicidal agent. However, these cells also act as hosts for *Toxoplasma gondii*, which adapted efficient strategies for intracellular survival. In the present study, membrane compounds from *T. gondii* were extracted and used to evaluate macrophage response to the parasite. Treatment of these cells with hydrophobic fractions from tachyzoites of *T. gondii* stimulated differently NO production in J774 cells and in peritoneal macrophages from C57BL/6 e BALB/c mice. In addition, macrophages were infected with tachyzoites from *T. gondii*, after *in vitro* treatment with fractions and with an extract from *Serjania lethalis*, which presents anti-inflammatory property. Also, the percentage of infected macrophages from BALB/c was the highest among all other studied cells, and diminished by treatment with F0 fraction. Treatment with the extract of *S. lethalis* decreased NO production by LPS+IFN- γ -activated cells and inhibited infection by *T. gondii*. Our results show at first, that macrophages from mice from different genetic background present different susceptibility of infection by this parasite. Second, the extraction of highly hydrophobic compounds from tachyzoites of *T. gondii* can yield samples enriched with bioactive molecules that are capable to interfere on parasite-host cell interaction. Finally, NO release by activated macrophages can be regulated in order to prevent damages caused by an intense inflammatory response.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Macrófagos.....	1
1.2. Óxido Nítrico.....	2
1.3. Macrófagos na resposta imune contra patógenos.....	3
1.4. Receptores e moléculas de interação em macrófagos.....	6
1.5. <i>Toxoplasma gondii</i>	7
1.6. Susceptibilidade e resistência a <i>T. gondii</i>	9
1.7. Moléculas de interação de <i>T. gondii</i> com células hospedeiras.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Animais.....	13
3.2. Manutenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i> em camundongos.....	13
3.3. Manutenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i> em cultura celular.....	14
3.4. Extração seqüencial em solventes orgânicos dos componentes de membrana de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	14
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE).....	17
3.6. Coloração de géis de poliacrilamida por PAS/prata.....	17
3.7. Análise em cromatografia em camada delgada (TLC).....	18
3.8. Tratamento de macrófagos J774 em diferentes condições.....	19

3.8.1. Tratamento de células J774 com frações de <i>T. gondii</i> provenientes de lavado peritoneal e de cultura de fibroblastos.....	19
3.8.2. Tratamento de células J774 com frações de <i>T. gondii</i> aquecidas previamente.....	20
3.8.3. Tratamento dos macrófagos com anti-TLR2.....	20
3.8.4. Tratamento dos macrófagos com <i>S. lethalis</i>	20
3.9. Ativação de macrófagos e interação com <i>T. gondii</i>	21
3.10. Ativação de macrófagos J774 e fagocitose de <i>T. gondii</i>	22
3.11. Determinação da produção de óxido nítrico.....	22
3.12. Ensaio de Citotoxicidade.....	23
3.13. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Frações de <i>T. gondii</i> , com diferentes graus de hidrofobicidade, apresentam perfis glicoprotéicos diferentes.....	25
4.2. Análise em TLC das frações extraídas por dois diferentes métodos.....	27
4.3. Produção de NO por células J774 incubadas com frações de <i>T. gondii</i> , com diferentes graus de hidrofobicidade.....	29
4.4. Estudo comparativo das frações F1' e F2', tratadas pelo calor, quanto à capacidade de induzirem NO.....	31
4.5. Curva dose-resposta da produção de NO por macrófagos J774 estimulados com diferentes concentrações de F1' e F2'.....	33
4.6. Relação entre a hidrofobicidade e a ação estimulatória das frações de <i>T. gondii</i> sobre a produção de NO por células J774.....	34
4.7. Tratamento de macrófagos J774 em cultura com anticorpos anti-TLR2 concomitante ao tratamento com frações F1', F2' e F3'.....	36

4.8. Ação inibitória de extratos orgânicos de diversas plantas sobre a produção de NO por macrófagos J774.....	38
4.9. Efeito de extrato etanólico de <i>Serjania lethalis</i> sobre a produção de NO por macrófagos J774 estimulados com F0.....	40
4.10. Efeito de frações de <i>T. gondii</i> e do extrato etanólico de <i>S. lethalis</i> sobre a fagocitose de taquizoítos mortos pelo calor.....	41
4.11. Efeito de frações de <i>T. gondii</i> e de extrato etanólico de <i>S. lethalis</i> sobre o espraçamento, adesão e invasão de macrófagos J774 pelo parasito.....	43
4.12. Efeito de frações de <i>T. gondii</i> sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais residentes e inflamatórios de camundongos C57BL/6.....	45
4.13. Comparação entre macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 e BALB/c e macrófagos de linhagem J774 quanto à produção de NO, espraçamento, adesão e infecção, durante infecção por <i>T. gondii</i>	46
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Macrófagos

Organismos vertebrados se defendem contra microorganismos infecciosos através de um sistema imune sofisticado que se baseia tanto na resposta inata quanto adaptativa. Durante as últimas décadas, estudos sobre os mecanismos imunes de defesa têm sido focados principalmente sobre a caracterização da imunidade adaptativa. Somente nos anos recentes a contribuição da imunidade inata para a defesa do hospedeiro tem tido maior atenção (HOFFMANN *et al.*, 1999). Particularmente, tem sido estabelecido que a imunidade inata promove uma primeira linha de defesa essencial, e desempenha um papel central em estimular e orientar a resposta adaptativa subsequente (FEARON & LOCKSLEY, 1996). A imunidade inata é uma reação de defesa imediata que envolve a secreção de citocinas e outras substâncias, levando a um processo inflamatório de efeito antimicrobiano.

Os macrófagos desempenham um papel importante na defesa contra agentes infecciosos tanto durante a imunidade inata quanto adaptativa (MILLS, 2000; ALMEIDA, 2000; DENKERS, 2003). Certos componentes microbianos, como lipopolissacárides (LPS) e lipoproteínas de bactérias e glicolípídeos de protozoários, ativam macrófagos para liberação de citocinas, tal como IL-12, e reativos intermediários de nitrogênio, como óxido nítrico (NO), um importante agente microbicida (BRIGHTBILL *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2001; DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2003; LÜDER *et al.*, 2003). Os níveis de NO são mais elevados em macrófagos sinergicamente ativados com interferon- γ (IFN- γ) e LPS, sendo importantes para restringir a replicação de patógenos intracelulares como *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii* (MILLS *et al.*, 2000; LÜDER *et al.*, 2003).

1.2. Óxido Nítrico

Óxido nítrico é produzido pela transformação catalítica de L-arginina em citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas de NOS: a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), que são constitutivamente expressas em neurônios e no endotélio, e a NOS induzível, que é produzida por vários tipos celulares, inclusive por macrófagos, e tem sua expressão aumentada em células tratadas com IFN- γ (REIS *et al.*, 2001; LÜDER *et al.*, 2003; NAPOLITANO *et al.*, 2005). A produção de NO por macrófagos ativados representa um importante mecanismo microbicida para restringir a replicação de patógenos intracelulares (MILLS *et al.*, 2000; LÜDER *et al.*, 2003). Entretanto, o excesso de NO é responsável pela vasodilatação e hipotensão observadas no choque séptico e pode levar ao dano tecidual, ao colapso vascular e à morte (CHI *et al.*, 2003). Portanto, a produção de NO é essencial na defesa contra microrganismos, mas precisa ser regulada para serem evitados danos ao organismo.

O efeito de extratos de plantas sobre a atividade de iNOS tem sido estudado por vários autores e estes extratos têm se mostrado eficientes na inibição de NO (RIMBACH *et al.*, 2000; RYU *et al.*, 2003a; RYU *et al.*, 2003b; FERREIRA *et al.*, 2003; NAPOLITANO *et al.*, 2005). *Serjania lethalis* é uma trepadeira da família Sapindaceae (COSTA *et al.*, 2004) conhecida como timbó, cujo veneno é utilizado por índios brasileiros para matar peixes. Substâncias derivadas da planta, denominadas serjanóides, quando injetadas em mamíferos induzem à prostração, dispnéia, cianose, batimentos cardíacos ectópicos, e falência cardio-respiratória (TEIXEIRA *et al.*, 1984). Entretanto, *S. lethalis* tem sido usada na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatória e analgésica.

1.3. Macrófagos na resposta imune contra patógenos

O contato de macrófagos com os patógenos resulta em uma resposta inicial inata, cuja liberação de IL-12 estimula células “natural killer” (NK) a produzirem IFN- γ , responsável pela ativação de macrófagos (DERRICO & GOODRUM, 1996; SKEEN *et al.*, 1996). IFN- γ é uma citocina que estimula a atividade microbicida de macrófagos, aumentando a liberação de NO (DERRICO & GOODRUM, 1996; SHIBATA *et al.*, 1997), além de induzir a expressão de RNAm para IL-12 (YOSHIDA *et al.*, 1994), que é responsável pela diferenciação de precursores T “helper” (Th) para linfócitos T de padrão Th1 (MILLER, SKEEN & ZIEGLER, 1997; DENKERS & GAZZINELLI, 1998), para amplificação da resposta contra microrganismos invasores. A citocina IL-12 também ativa macrófagos e células dendríticas de maneira autócrina, principalmente nos primeiros estágios de infecção, estimulando a produção de IFN- γ , NO e atividade microbicida destas células (BASTOS *et al.*, 2004).

Este padrão de resposta é característico de macrófagos efetores na destruição dos patógenos. Estas células foram denominadas macrófagos M-1 por MILLS e colaboradores (2000). Estes macrófagos são responsáveis pela morte dos agentes microbianos através da fagocitose e liberação de NO, de reativos intermediários de oxigênio (ROIs) e lisozimas. Também atuam como células apresentadoras de antígenos e secretam citocinas como IL-1, IL-12 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), estimulando uma resposta inflamatória aguda. Um outro tipo de macrófagos, chamado M-2, produz pouco NO ao ser estimulado, pois direciona o metabolismo de arginina para a formação de ornitina, pela ação da arginase (MILLS *et al.*, 2000; MANTOVANI *et al.*, 2002). Estas células promovem a remoção de tecidos mortos, o reparo tecidual, através da liberação de fatores de crescimento, da angiogênese e da modulação da resposta inflamatória, pela liberação de IL-10 e fator de

transformação do crescimento- β (TGF- β) (BASTOS *et al.*, 2004; GRATCHEV *et al.*, 2005). Segundo MILLS *et al.* (2000) o conceito M-1/M-2 surgiu de observações de que macrófagos provenientes de linhagens de camundongos prototipicamente Th1 (C57BL/6, B10D12) são mais facilmente ativados para produção de NO do que macrófagos de linhagens Th2 (BALB/c, DBA/2). Além disso, macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 deficientes em IL-12/IL-23p40 adquirem perfil M-2 de ativação, passando a produzir altos níveis de TGF- β e baixos níveis de NO (BASTOS *et al.*, 2004), sugerindo que citocinas como IL-12 e IL-23 desempenham importante papel na polarização dos macrófagos. Na verdade, a polarização de macrófagos para M-1 ou M-2 depende também da exposição a diferentes sinais (por exemplo, citocinas de padrão Th1 ou Th2) em diferentes momentos e locais, constituindo um processo dinâmico e contínuo (MANTOVANI *et al.*, 2002). A figura 1 esquematiza a polarização de macrófagos e moléculas envolvidas.

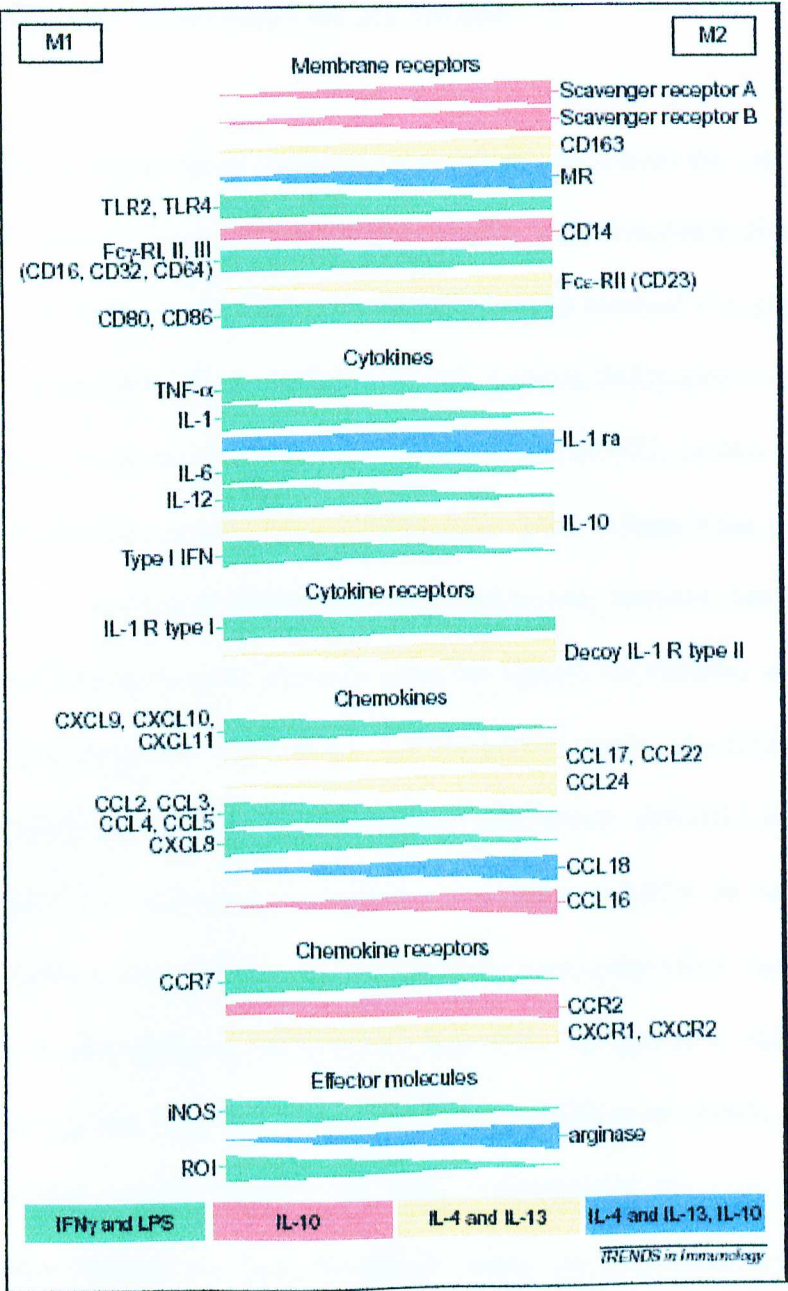


Figura 1. Macrófagos M-1 e M-2 (MANTOVANNI *et al.*, 2002).

1.4. Receptores e moléculas de interação em macrófagos

Os macrófagos possuem vários receptores e moléculas de adesão em sua superfície, diretamente relacionados com sua distribuição nos tecidos, suas funções e discriminação entre seus ligantes. Um exemplo de marcador de distribuição tecidual é a glicoproteína MGL1, importante na migração de macrófagos da pele para os linfonodos e acúmulo de macrófagos nas regiões interfoliculares destes órgãos (KUMAMOTO, 2004). Em relação aos mecanismos efetores dos macrófagos, a sinalização para a fagocitose depende da ligação de moléculas a receptores como selectinas, integrinas, lectinas, receptores Fc, receptores “scavenger”, receptores de manose, proteína ligante de manose, entre outros (GORDON, 1995). Os receptores “scavenger” CD36, por exemplo, são importantes na eliminação de eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum* (McGILVRAY *et al.*, 2000). Outro exemplo são receptores de manose e proteínas ligantes de manose, que reconhecem glicoproteínas presentes na superfície de *Trypanosoma cruzi* específicas de formas amastigotas. A interação de amastigotas com estes receptores é utilizada pelo parasito para invadir e replicar no interior dos macrófagos (KAHN *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido concentrados em uma família de receptores diretamente relacionada com imunidade inata, os receptores do tipo Toll (TLRs). Estes estão envolvidos nas vias de sinalização para produção de citocinas e outros agentes inflamatórios e desempenham um papel importante no reconhecimento e discriminação de patógenos (MUZIO *et al.*, 2000, THOMA-USZYNSKI *et al.*, 2001). Pelo menos 11 membros da família TLR já foram identificados: TLR-1 a TLR-11 (SATOSHI & SHIZUO, 2004). Dois membros desta família, TLR-4 e TLR-2, estão bem caracterizados como receptores para LPS de bactérias Gram-negativas e para outros produtos bacterianos (peptideoglicanas e lipopeptídeos), respectivamente (O'NEILL *et al.*, 2001; TAKEUCHI

& AKIRA, 2001). Recentemente, em experimentos com animais deficientes em TLR-2 e TLR-4, foi demonstrado que TLR-2 é essencial na defesa contra *T. gondii* (MUN *et al.*, 2003). Sabe-se também que TLR-2 forma heterodímeros com TLR-6 e que a formação do complexo TLR-2/TLR-6/CD36 é essencial no reconhecimento de vários ligantes de TLR-2, especialmente diacilglicerídeos (HOEBE *et al.*, 2005).

Os macrófagos também podem expor em sua superfície moléculas comuns a vários tipos celulares e tecidos, como por exemplo moléculas sulfatadas componentes de matriz extracelular (heparina e condroitina), que podem funcionar como receptores para adesão de uma variedade de patógenos, como vírus (DELPUTTE *et al.*, 2005), bactérias (BALDASSARRI *et al.*, 2005) e protozoários (ORTEGA-BARRIA *et al.*, 1999), e conseqüente infecção celular.

1.5. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um coccídeo intracelular pertencente ao filo Apicomplexa, capaz de invadir e se replicar em qualquer célula nucleada (JOINER *et al.*, 1990; KASPER & MINEO, 1994; DOBROWOLSKI *et al.*, 1997; DENKERS & GAZZINELLI, 1998; MORDUE *et al.*, 1999; CARRUTHERS *et al.*, 2000). Tem como hospedeiros definitivos os felinos, que eliminam oocistos para o ambiente pelas fezes. Os hospedeiros intermediários, que compreendem uma variedade de espécies de vertebrados, inclusive o homem, são infectados ao entrar em contato com oocistos esporulados e após ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais. Uma vez ingeridos, os oocistos infectam as células epiteliais do intestino e se transformam em taquizoítos, que se multiplicam rapidamente por endodiogenia, dentro de vacúolos intracelulares. Quando as células infectadas se tornam repletas de taquizoítos, ocorre rompimento da membrana

plasmática, liberação dos parasitos para o meio extracelular e infecção de novos tecidos (DENKERS & GAZZINELLI, 1998; ORTEGA-BARRIA & BOOTHOYD, 1999). Pela circulação sanguínea e linfática, o parasito alcança vários tecidos, principalmente sistema nervoso central, olhos, músculos esquelético e cardíaco, onde se multiplicam lentamente no interior de cistos. As formas de multiplicação lenta são chamadas bradizoitos e persistem no hospedeiro sem ativar a resposta inflamatória (DUBEY *et al.*, 1998).

T. gondii invade as células hospedeiras por um processo ativo dependente do citoesqueleto de actina do parasito (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996; CHARRON & SIBLEY, 2002). Neste processo estão envolvidas organelas especializadas que se localizam na porção anterior do parasito. A adesão do parasito na célula hospedeira é mediada por proteínas de superfície do parasito que se ligam a proteínas ou carboidratos presentes na membrana da célula hospedeira. Logo após este contato, ocorrem a protrusão do conóide de *T. gondii* e a secreção do conteúdo de organelas citoplasmáticas denominadas micronemas e roptrias (KASPER & MINEO, 1994; ORTEGA-BARRIA & BOOTHOYD, 1999).

Após o processo de invasão da célula hospedeira, *T. gondii* permanece dentro de um compartimento especializado, conhecido como vacúolo parasitóforo, livre dos mecanismos de defesa da célula hospedeira (MORDUE *et al.*, 1999; CARRUTHERS *et al.*, 2000; CHARRON & SIBLEY, 2002). A formação do vacúolo parasitóforo depende do reconhecimento pelo parasito de moléculas na membrana das células hospedeiras, compartilha lipídeos das células hospedeiras e do parasito (CARRUTHERS *et al.*, 2000; CHARRON & SIBLEY, 2002) e exclui proteínas de membrana da célula hospedeira, o que evita sua fusão com organelas como os lisossomos (MORDUE *et al.*, 1999; CHARRON & SIBLEY, 2002). Acredita-se que lipídeos secretados pelas roptrias do parasito contribuam para a formação do vacúolo, mas para sobreviver e replicar dentro da célula hospedeira, o

parasito utiliza não só lipídeos da célula hospedeira, mas também toda uma maquinaria de síntese de lipídeos (CHARRON & SIBLEY, 2002).

1.6. Susceptibilidade e resistência a *T. gondii*

Em humanos, a toxoplasmose geralmente é uma infecção assintomática. Entretanto a primo-infecção em gestantes pode causar toxoplasmose congênita, podendo levar ao aborto. Além disso, a toxoplasmose faz parte de um grupo de infecções oportunistas importantes em indivíduos imunossuprimidos (TOMAVO *et al.*, 1992; DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2003; LÜDER *et al.*, 2003). A capacidade de indivíduos imunocompetentes em controlar a doença é devido a uma imunidade celular forte, associada com a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e produção de citocinas de padrão Th1, principalmente IFN- γ (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2003).

Em modelos murinos, existe uma diferença de susceptibilidade marcante entre linhagens de camundongos. Camundongos susceptíveis à infecção por *T. gondii* (C57BL/6) sucumbem devido a uma necrose intestinal severa, causada por um processo inflamatório intenso, mediado pela produção local de IFN- γ , TNF- α e NO (LIESENFELD *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 2000; VOSENKAMPER *et al.*, 2004). Camundongos resistentes à infecção por *T. gondii* (BALB/c) possuem uma imunidade protetora mediada por IFN- γ , e não desenvolvem necrose intestinal (LIESENFELD *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 2000). Existe uma grande diferença quanto à carga parasitária em relação a estas duas linhagens. Quando são administrados 100 cistos da cepa Me49 de *T. gondii* via oral aos camundongos, os animais resistentes (BALB/c) sobrevivem, enquanto que a sobrevivência de camundongos C57BL/6 só é conseguida com baixa carga parasitária, ou seja, 20 cistos via oral (SUZUKI *et al.*, 2000).

Os macrófagos possuem um papel importante no controle da infecção por *T. gondii* principalmente pela produção de altos níveis de IL-12, e aumento da expressão de iNOS. Entretanto, camundongos infectados com *T. gondii* aumentam também a produção de IL-10, que está envolvida na regulação da produção de IL-12 e de outras citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (DENKERS & GAZZINELLI, 1998; FUX *et al.*, 2003). Em estudo utilizando camundongos deficientes em IL-10 de ambas linhagens (C57BL/6 e BALB/c), a infecção com *T. gondii* levou à morte de 100% dos animais em cerca de 10 dias, mesmo com baixa carga parasitária (SUZUKI *et al.*, 2000).

1.7. Moléculas de interação de *T. gondii* com células hospedeiras

Muitos autores têm demonstrado que os taquizoítas de *T. gondii* interagem com as células hospedeiras através do contato de receptores específicos e seus ligantes. CARRUTHERS *et al.* (2000) demonstraram que *T. gondii* reconhece glicosaminoglicanas (GAGs) da membrana celular das células hospedeiras, e que este reconhecimento é essencial para a invasão celular. ORTEGA-BARRIA *et al.* (1999) demonstraram que heparan sulfato é importante na infecção de células epiteliais por *T. gondii*.

MINEO *et al.* (1993) mostraram que a invasão de células hospedeiras por taquizoítas pode ser inibida tratando-se o parasito com anticorpos dirigidos contra sua principal proteína de superfície, SAG1. Entretanto, o fato de mutantes deficientes em SAG-1 ainda serem capazes de infectar células hospedeiras sugere que outras moléculas do parasito contribuam para a infecção (MINEO *et al.*, 1993), como outros antígenos de superfície e também moléculas liberadas das roptrias e micronemas. Estas moléculas fazem parte de um grupo de proteínas de *T. gondii* altamente imunogênicas, os antígenos de excreção/secreção (ESAs). Estes antígenos levam a uma resposta imune inicial forte, tanto

durante a infecção quanto a imunização, e estão presentes no soro do organismo hospedeiro mesmo antes da detecção de anticorpos (RAHMAH & ANUAR, 1992; GRIMWOOD & SMITH, 1996).

Além de SAG-1 e ESAs, outros componentes de *T. gondii*, como os glicolípídeos glicofosfatidilinositol (GPI) e glicoinositolfosfolípídes (GIPLs), que ancoram proteínas de superfície do parasito, têm sido estudados por ativar células do sistema imune do hospedeiro. GPI de *T. gondii* foi demonstrada ser importante na indução da produção de TNF- α por macrófagos murinos (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2003). Estas moléculas podem ser purificadas por cromatografia a partir de extrato orgânico de taquizoítas de *T. gondii* e são bons antígenos para testes sorológicos (TOMAVO, 1992; GIRALDO *et al.*, 2000).

Os mecanismos de interação entre macrófagos e *T. gondii* têm sido abordados por vários autores, sob diferentes aspectos. No presente trabalho, a interação *T. gondii*-macrófagos será abordada com enfoque nas diferenças entre macrófagos M-1 e M-2, no efeito do tratamento com moléculas do próprio parasito e na modulação da resposta inflamatória. Para isso, serão mensurados os níveis de produção de NO como mediador da resposta inflamatória, bem como as porcentagens de adesão, fagocitose e invasão como parâmetros de interação entre o parasito e a célula hospedeira.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a interação entre macrófagos murinos e *Toxoplasma gondii* sob a influência de componentes do próprio parasito e de *Serjania lethalis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e determinar a natureza de diferentes frações dos componentes de membrana de *T. gondii*.
- Verificar se macrófagos J774 respondem ao estímulo com frações de *T. gondii*, comparando suas respostas (produção NO e fagocitose) com as de células estimuladas com LPS.
- Verificar o efeito de anticorpos contra TLR2 sobre a produção de NO por macrófagos J774 estimulados por frações de *T. gondii*.
- Observar o efeito das frações sobre a infecção de macrófagos murinos por *T. gondii*.
- Comparar a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6
- Verificar o efeito do extrato de *Serjania lethalis* em macrófagos murinos, sobre a produção de NO e sobre a infecção por *T. gondii*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, de 6 a 8 semanas, para manutenção de taquizoítos de *T. gondii*. Para a obtenção de macrófagos peritoneais inflamatórios, foram utilizados camundongos isogênicos machos, de 6 a 8 semanas, das linhagens BALB/c e C57BL/6. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

3.2. Manutenção de taquizoítos de *T. gondii* em camundongos

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por passagem serial em cavidades peritoneais de camundongos Swiss. Para os experimentos de extração orgânica, os taquizoítos foram lavados 3 vezes com PBS estéril, reunidos até obtenção de 10^{10} parasitos e estocados a -70°C . Para realizar a infecção dos macrófagos, suspensões de taquizoítos recentemente coletados foram centrifugadas a $70 \times g$ por 1 minuto, a fim de eliminar células peritoneais presentes na suspensão. O sobrenadante foi coletado e centrifugado por $1000 \times g$ por 10 minutos. O sedimento foi utilizado para estimar o número de parasitos e para os ensaios de infecção na razão parasito/célula de 5:1. Para os ensaios de fagocitose os parasitos foram mortos após incubação de 1 hora a 56°C .

3.3. Manutenção de taquizoítos de *T. gondii* em cultura celular

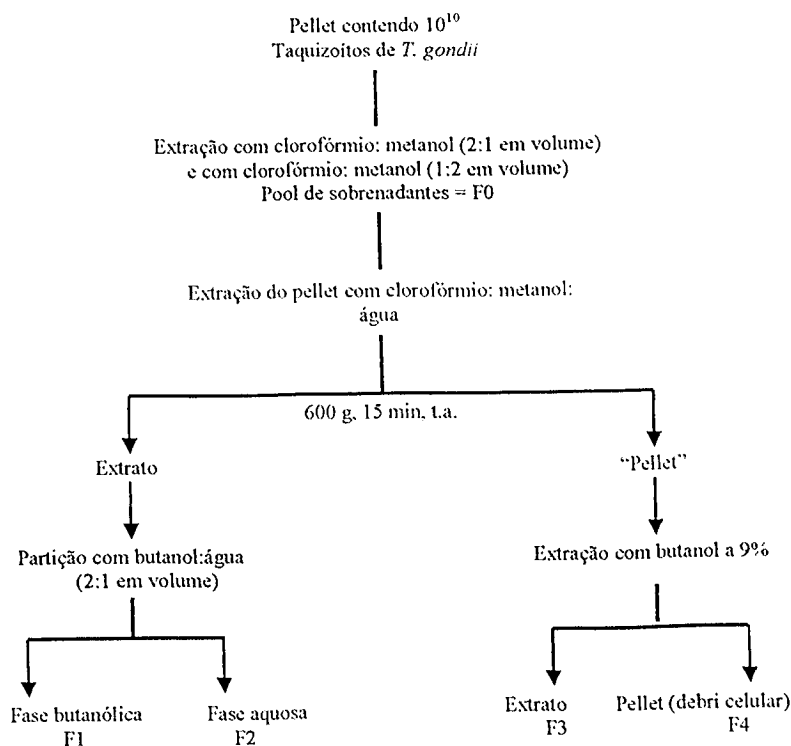
Foram utilizados fibroblastos humanos da linhagem HFF [American Tissue Culture Collection (Rockville, MD)] para a manutenção *in vitro* dos taquizoítos de *T. gondii*. As células foram mantidas em cultura em frascos de 25 mm² em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Quando as culturas de fibroblastos estavam sub-confluentes, as células foram infectadas com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. O meio foi substituído por RPMI contendo 2 % de SBF e os parasitos assim mantidos até romperem as células. Repiques periódicos foram realizados para manutenção da cepa. Para a realização dos experimentos, os taquizoítos foram processados da mesma forma que no item anterior.

3.4. Extração sequencial em solventes orgânicos dos componentes de membrana de taquizoítos de *T. gondii*

O fracionamento dos componentes de membrana de taquizoítos de *T. gondii* foi realizado seguindo procedimentos descritos anteriormente (TOMAVO *et al.*, 1992; ALMEIDA *et al.*, 2000; GIRALDO *et al.*, 2000) com algumas modificações (figura 2). Brevemente, 10¹⁰ taquizoítos provenientes de lavado peritoneal ou de cultura de fibroblastos foram extraídos 3 vezes (seguido de 5 minutos de agitação vigorosa e 1 minuto de sonicação) com 3-5 mL de cada uma das seguintes misturas de solventes orgânicos: (i) clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e (ii) clorofórmio:metanol (1:2, v/v). Entre cada extração, debris celulares insolúveis foram separados da fase orgânica por centrifugação (600 x g, 15 minutos, a temperatura ambiente). As fases orgânicas resultantes foram reunidas, secas e chamadas F0. Os debris

celulares delipidados foram secos em fluxo de N_2 e extraídos 3 vezes (seguido de 5 minutos de agitação vigorosa e 1 minuto de sonicação) com 3-5 mL de clorofórmio:metanol:água (5:10:4, v/v) e centrifugados novamente para separação de fases. A fase orgânica foi seca e extraída com 1-butanol:água (2:1, v/v) e o precipitado foi também seco e extraído 3 vezes com 1-butanol saturado com água (1-butanol a 9%) por 3 horas, sob agitação a temperatura ambiente. Os extratos resultantes da extração com 1-butanol:água (2:1) foram secos e chamados F1 (fase butanólica) e F2 (fase aquosa). Os extratos resultantes da extração com 1-butanol saturado com água foi chamado F3. O armazenamento destas frações foi realizado a $-20^{\circ}C$, após a dissolução em 2 mL de clorofórmio:metanol (2:1) (para a fração F0) e clorofórmio:metanol:água (5:10:4) (para as frações F1 e F2). O mesmo protocolo iniciado a partir da extração com clorofórmio:metanol:água (5:10:4, v/v), ou seja, sem o passo de deslipidação com clorofórmio:metanol, forneceu outras frações que foram chamadas F1', F2' e F3'. A diferença entre os dois protocolos está mostrada na figura 2.

A



B

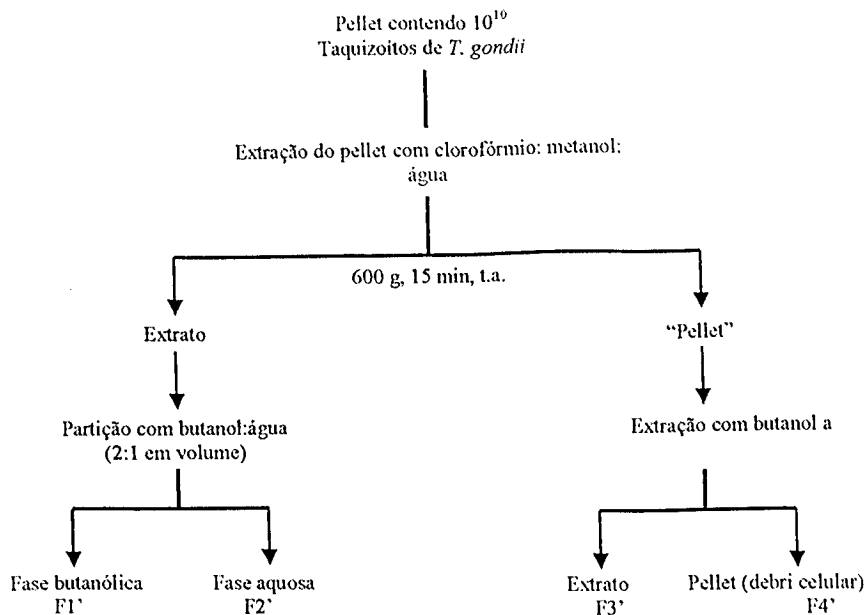


Figura 2. Protocolos para extração orgânica de componentes de membrana de taquizoitos de *T. gondii* com diferentes graus de hidrofobicidade. (A) obtenção de frações F0, F1 e F2. (B) obtenção de frações F1', F2' e F3'.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE)

Para a eletroforese foram utilizados mini-géis de 0,75 mm x 5 cm x 9 cm. A porcentagem final de acrilamida no gel de separação foi de 12%. Os géis de separação foram feitos misturando-se uma solução de poliacrilamida (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida) com tris-HCl pH 8,8, dodecil sulfato de sódio (SDS), água deionizada e agentes polimerizantes (TEMED e persulfato de amônia a 10%). Uma vez polimerizado o gel de separação, foi acrescentada uma solução de poliacrilamida a 4% com tris-HCl pH 6,8, SDS, água deionizada e agentes polimerizantes para o gel de empacotamento. Antes de serem preparadas para aplicação no gel, as amostras foram secas para eliminação dos solventes orgânicos. O padrão de peso molecular, assim como as amostras a serem avaliadas foram dissolvidas em tampão de amostra (0,5 M de tris-HCl, SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,2%) e foram aquecidos por 5 minutos a 100°C. Volumes correspondentes a 3×10^7 parasita equivalentes/mL de amostra foram aplicados nos géis. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente com tampão de corrida glicina, trizma base e SDS, pH 8,5. A amperagem utilizada foi de 20 mA por gel, durante o empacotamento e separação das amostras.

3.6. Coloração de géis de poliacrilamida por PAS/prata

Após eletroforese, os géis foram desmontados e fixados por 24 horas a temperatura ambiente em solução contendo ácido acético a 5% e etanol a 40%. A seguir os géis foram tratados por 5 minutos sob agitação com solução contendo ácido acético a 4% e etanol a 40% e ácido periódico a 0,7%. Após lavar 3 vezes com água destilada por 15 minutos, os géis foram impregnados com nitrato de prata a 0,7% em solução de hidróxido de amônio a

1,3% e 0,02 N de hidróxido de sódio. Após lavar 3 vezes com água destilada por 10 minutos, os géis foram mergulhados em solução reveladora com ácido cítrico a 0,01%, formaldeído a 0,074%. A reação foi interrompida com solução de ácido acético a 10% e metanol a 50%. Os géis foram montados em papel celofane e secos ao ar.

3.7. Análise em cromatografia em camada delgada (TLC)

Para a realização da TLC foram utilizadas placas de sílica gel 60 obtidas da Merck. Antes da aplicação das amostras as placas foram ativadas, para eliminação de umidade, por 60 minutos a 105-110°C. As placas foram ainda colocadas em cuba de vidro pré-equilibradas (por 1 hora) com a mistura de solventes (fase móvel) a um nível de 1 cm no fundo e embebendo papéis que filtro que cobrem as paredes. As placas foram deixadas na cuba até a fase móvel percorrer as placas por inteiro, atingindo o ponto final da corrida (cerca de 45 minutos). Após este período, estas foram retiradas e secas ao ar. A mistura de solventes escolhida como fase móvel para as frações de *T. gondii* foi clorofórmio:metanol:KCl a 0,2% (10:10:3), de acordo com Tomavo e colaboradores (1992). As amostras e padrões, dissolvidos em solventes orgânicos, foram aplicados nas placas em pontos previamente marcados, distantes um do outro em 1 cm e da base da placa em 1,5 cm. O ponto de aplicação foi chamado de origem. Foram aplicadas alíquotas de 10 µL de amostras, que correspondem a $1-3 \times 10^7$ parasita equivalentes/mL, e 2 µL de padrão (de 10 mg/2 mL de uma mistura dos gangliosídeos GM1, GD1a, GD1b e GT1b). Depois de o material aplicado estar seco, as placas foram novamente colocadas na cuba e deixadas até que a fase móvel atingisse o ponto final da corrida. As placas foram retiradas, secas ao ar e borrifadas com o reagente Orcinol (180 mg de orcinol, 5 ml de água deionizada, 75 ml de etanol gelado e 10 ml de ácido sulfúrico). A revelação ocorreu após aquecimento das placas por 30 minutos a

100-120°C. A posição das manchas foi calculada dividindo-se a distância do centro da mancha até a origem pela distância da origem ao ponto final da corrida (Rf).

3.8. Tratamento de macrófagos J774 em diferentes condições

Antes dos experimentos de ativação e infecção de macrófagos com *T. gondii* e de fagocitose do parasito, macrófagos da linhagem J774 [American Tissue Culture Collection (Rockville, MD)] foram tratados com as frações do parasito sob diferentes condições, para avaliar a natureza e ação destas frações. Além disso, estas células foram tratadas com extratos de *Serjania lethalis* e outras plantas, para avaliar seu efeito na produção de NO por células estimuladas com LPS e IFN- γ .

3.8.1. Tratamento de células J774 com frações de *T. gondii* provenientes de lavado peritoneal e de cultura de fibroblastos

Macrófagos J774 foram adicionados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/mL (em 200 μ L de RPMI) e cultivadas por 24 horas para aderirem nas placas. Após este período, o meio foi substituído por meio fresco sozinho (controle negativo), ou contendo LPS (10 μ g/mL) mais IFN- γ (1 ng/mL) (controle positivo) ou com frações F1' ($2,5 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL), F2' (5×10^7 parasita-equivalentes/mL) e F3' (5×10^7 parasita-equivalentes/mL) de *T. gondii*. Foram utilizadas frações obtidas de taquizoítas da cepa RH provenientes de lavado peritoneal de camundongos ou de cultura de fibroblastos humanos. Após 48 horas de tratamento os sobrenadantes foram coletados para determinação de óxido nítrico.

3.8.2. Tratamento de células J774 com frações de *T. gondii* aquecidas previamente

Macrófagos J774 foram adicionados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/mL (em 200 μ L de RPMI) e cultivadas por 24 horas para aderirem nas placas. Após este período, o meio foi substituído por meio fresco sozinho, ou contendo LPS (10 μ g/mL), IFN- γ (1 ng/mL), LPS mais IFN- γ e frações (F1' e F2', $2,5 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL) de *T. gondii*, aquecidos ou não a 95°C por 5 minutos. Após 48 horas de tratamento os sobrenadantes foram coletados para determinação de óxido nítrico.

3.8.3. Tratamento dos macrófagos com anti-TLR2

Macrófagos J774 foram adicionados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/mL (em 200 μ L de RPMI) e cultivadas por 24 horas para aderirem nas placas. Após este período, o meio foi substituído por meio fresco contendo anticorpos IgG2a anti-TLR2 (10 μ g/mL) ou IgG2a controle (10 μ g/mL). Após 24 horas foram adicionadas aos poços frações F1', F2' e F3' ($2,5 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL), ou apenas meio. Foram utilizadas frações obtidas de taquizoítas da cepa RH provenientes de lavado peritoneal de camundongos. Após 48 horas de tratamento os sobrenadantes foram coletados para determinação de óxido nítrico.

3.8.4. Tratamento dos macrófagos com *S. lethalis*

Macrófagos J774 foram adicionados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/mL (em 200 μ L de RPMI) e cultivadas por 24 horas para aderirem nas placas. Após este período, o meio foi substituído por meio fresco sozinho, ou contendo LPS (10 μ g/mL) mais IFN- γ (1 ng/mL), LPS mais IFN- γ mais extrato de *S. lethalis* (10 μ g/mL)

(gentilmente cedido pela Profa. Dra. Laila Salmen Espindola de Universidade de Brasília, Brasília, DF). Outros extratos de diferentes partes (caule, folha e raiz) de *Casaria sylvestris* (família Flacourtiaceae) e *Cupania vernalis* (família Sapindaceae) também foram testados, por também possuírem propriedades anti-inflamatórias.

3.9. Ativação de macrófagos e interação com *T. gondii*

Macrófagos inflamatórios foram obtidos de lavados peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c previamente (4 dias antes) recrutados com 1 mL de tioglicolato via i.p. Macrófagos J774 também foram utilizados neste experimento. 1×10^5 células/mL foram cultivadas em lamínulas de vidro (200 μ L) em placas de 6 poços por 24 horas em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de SBF, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (RPMIc), em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes foram coletados para determinação de nitrito. As células foram adicionadas de meio fresco contendo 10 μ g/mL de LPS mais 1ng/mL de IFN- γ , ou 10 a 20 μ L de frações (F0, F1, F2) de *T. gondii*. Após 24 horas de incubação, alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes das células assim tratadas foram coletados para determinação de nitrito. As células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* numa razão parasita/célula de 5:1. Células não tratadas com nenhum estímulo também foram infectadas com taquizoítos. Neste caso, os taquizoítos eram tratados previamente por 1 hora com as frações de *T. gondii* ou simplesmente incubados a 37°C (controle). Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes das células foram coletados para determinação de nitrito. As células foram fixadas em metanol gelado por 10 minutos e coradas com Giemsa. As lamínulas foram montadas sobre lâminas contendo solução de montagem e examinadas em microscópio óptico. O número de células espalhadas, células com parasitos aderidos e

células infectadas foi determinada contando-se um número total de 200 células por campo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os reagentes de cultura foram adquiridos da Gibco (Paisley, UK) e o LPS foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, USA). As células e os parasitos foram testados para contaminação com *Mycoplasma* sp. por PCR em empresa especializada (SIMBIOS Biotecnologia, Canoas, RS, Brasil).

3.10. Ativação de macrófagos J774 e fagocitose de *T. gondii*

Macrófagos J774 (1×10^5 células/mL) foram cultivadas em laminulas de vidro (200 μ L) em placas de 6 poços por 24 horas em meio RPMIc em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. As células foram adicionadas de meio fresco contendo 10 μ g/mL de LPS mais 1ng/mL de IFN- γ , ou 10 a 20 μ L de frações (F0, F1, F2) de *T. gondii*. As células foram incubadas com taquizoítos mortos (aquecimento a 56°C por 1 hora) de *T. gondii* numa razão parasita/célula de 5:1. Células não tratadas com nenhum estímulo também foram incubadas com taquizoítos (controle). As células foram ainda tratadas com extrato de *S. lethalis* juntamente com as frações. Após 48 horas de fagocitose, as células foram fixadas por 10 minutos com metanol gelado e coradas com Giemsa para determinação de espreadimento, adesão e fagocitose.

3.11. Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi estimada, dosando-se nitrito (NO₂⁻) acumulado nos sobrenadantes, através do método de Griess. Brevemente, volumes iguais (50 μ L) de amostras e do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e α -naftilamina a 0,1% (v/v) em ácido fosfórico a 2,5%) foram misturados em placas de 96 poços e estas foram incubadas a

temperatura ambiente por 10 minutos. Os reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os valores de absorbância foram mensurados a 570 nm em espectrofotômetro Titertek Multiskan Plus. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão de concentrações variando de 1,56 μM a 200 μM de nitrito de sódio.

3.12. Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado determinando-se a viabilidade celular, como descrito por Mosmann (1983). Brevemente, as células foram tratadas em cultura, em placas de 96 poços, com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (1 ng/mL), com extratos de plantas e com as frações de *T. gondii* por 48 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes foram retirados e as células foram incubadas por 4 horas com 10 μL de “thiazolyl blue” (MTT), em 90 μL de RPMIc. Neste período, o MTT (composto solúvel amarelo) é convertido em formazan (precipitado azul) pelas desidrogenases mitocondriais ativas de células viáveis. O precipitado insolúvel azul foi solubilizado em 0,1 N de HCl em isopropanol e os valores de absorbância foram mensurados a 570 nm (OD₅₇₀). A intensidade de cor lida neste comprimento de onda está relacionada com o número de células vivas.

A viabilidade e a citotoxicidade foram calculadas de acordo com as fórmulas descritas por Zamora (1998):

$$\text{Viabilidade (\%)} = [(\text{OD}_{570} \text{ amostra} - \text{OD}_{570} \text{ branco}) / (\text{OD}_{570} \text{ controle} - \text{OD}_{570} \text{ branco})] \times 100$$

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = 100 - \text{viabilidade (\%)}$$

Onde OD₅₇₀ controle representa a absorbância dos sobrenadantes de células cultivadas sem tratamento, OD₅₇₀ branco representa a absorbância do meio RPMIc, e OD₅₇₀ amostra representa a absorbância dos sobrenadantes de células cultivadas com LPS, IFN- γ , extratos

de plantas e frações. Para os experimentos com extratos de plantas os resultados foram expressos como IC_{50} (concentração inibitória 50), que representa a concentração (em mg/ μ L) dos extratos responsáveis por 50% de morte das células. A IC_{50} foi obtida através de curvas de regressão de 10 a 200 μ g/mL a partir de dois experimentos independentes. Para os experimentos com as frações de *T. gondii* os resultados foram expressos como porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade celular, a partir de dois experimentos independentes.

3. 13. Análise Estatística

Os valores obtidos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de determinações em triplicata. A significância das diferenças entre as condições experimentais e os controles foi determinada utilizando a diferença entre duas proporções pela estatística Z, para comparação da porcentagem de espreadimento, adesão e infecção/fagocitose. A comparação entre os níveis de NO foi realizada usando teste “t” de Student. Os programas utilizados foram GraphPad Prism, v.4.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA) e Statistica/W, v.5.0 (Statsoft, Tulsa, USA). Níveis de $p < 0,05$ foram escolhidos como critério para significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1. Frações de *T. gondii*, com diferentes graus de hidrofobicidade, apresentam perfis glicoprotéicos diferentes.

O fracionamento dos componentes de membrana dos taquizoítos permite a separação de diferentes frações, de acordo com o grau de hidrofobicidade. Diferentes protocolos podem gerar frações com um gradiente de hidrofobicidade. De acordo com o protocolo descrito por Giraldo e colaboradores (2000), F1' é a fração mais hidrofóbica (rica, por exemplo, em fosfolipídios), F2' é uma fração intermediária (contendo glicosilinositolfosfolipídeos (GIPLs)) e F3' é mais hidrofílica (contendo glicoproteínas ligadas a âncoras GPI). F4' é considerada como contendo restos celulares e componentes não solubilizados no sistema de solventes utilizado. De acordo com o protocolo descrito por Almeida e colaboradores (2000), F0 é a fração mais hidrofóbica e contém principalmente lipídeos neutros, fosfolipídios e glicolipídeos menos polares; F1 a intermediária e F2 a fração menos hidrofóbica. O perfil eletroforético das moléculas presentes nestas frações está mostrado na figura 3. O fracionamento foi realizado utilizando-se taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de líquido da cavidade peritoneal de camundongos Swiss. Segundo Giraldo e colaboradores o perfil eletroforético é o mesmo quando utilizados taquizoítos provenientes de líquido peritoneal de camundongos e de cultura celular. Podemos observar que na pista correspondente a F1' não é evidenciada a presença de componentes protéicos, mas sim uma grande sombra clara de material não corado pelo PAS/ prata, um indicativo de que F1' é rica em moléculas de natureza não protéica (figura 3 A). A presença de componentes protéicos também não é evidenciada na pista correspondente a F0 (figura 3 B). F2' apresenta uma banda larga de baixo peso de glicoproteína (figura 3 A), que pode ser notada

também para F1 (figura 3 B), porém menos intensa. F3' e F2 apresentam um número maior de bandas coradas pelo PAS/ prata, sugerindo uma maior presença de moléculas glicoprotéicas.

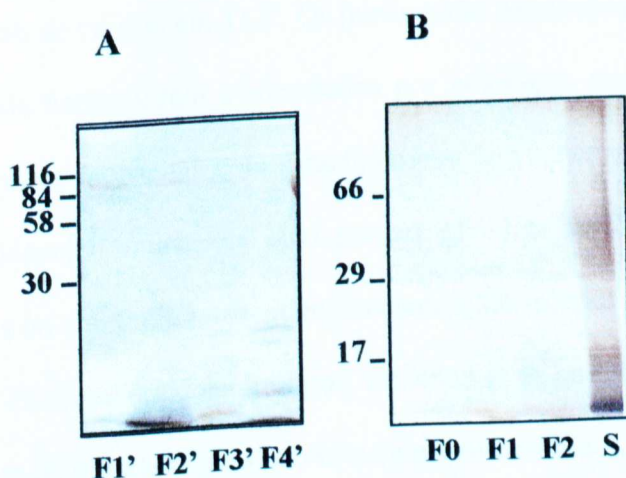


Figura 3: Perfil eletroforético de moléculas obtidas do fracionamento de membrana de taquizoítos de *T. gondii*. Volumes correspondentes a 3×10^7 parasita equivalentes/mL de amostras foram aplicados em géis SDS-PAGE a 12%. Os géis foram corados pelo método de PAS/ prata, que evidencia conjugados glicoprotéicos. (A) Frações obtidas pelo método de Giraldo e colaboradores (2000). **F1'**: fração mais hidrofóbica. **F2'**: hidrofobicidade intermediária. **F3'**: fração mais hidrofílica. **F4'**: fração rica em debris celulares. (B) Frações obtidas pelo método de Almeida e colaboradores (2000). **F0**: fração mais hidrofóbica. **F1**: hidrofobicidade intermediária. **F2**: fração mais hidrofílica. **S**: antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii*. As posições dos marcadores de peso molecular, em Kilodaltons (kDa), são indicadas à esquerda de cada gel.

4.2. Análise em cromatografia em camada delgada (TLC) das frações extraídas por dois diferentes métodos

As frações obtidas pelos dois protocolos já mencionados foram também analisadas de acordo com seus perfis de corrida em TLC. Os perfis estão mostrados nas figuras 4A e 4B e os produtos de cada fração foram evidenciados por coloração com Orcinol e indicam moléculas ou misturas de moléculas com características de glicoconjugados. A coloração por orcinol não evidenciou moléculas com porção glicídica na fração F0, sugerindo ausência das mesmas ou que estas apresentam concentrações inferiores as detectáveis pelo corante (figura 4A). F2 apresenta dois produtos, um mais forte que migrou mais (valor de R_f de 0,68), por ter mais afinidade pelo solvente (mais hidrofóbico), e outro mais claro e menos hidrofóbico (valor de R_f de 0,45).

F1 apresenta um produto na mesma altura do produto mais hidrofóbico encontrado em F2 (valor de R_f de 0,68). Na figura 4B, apenas F1' apresentou um produto corado pelo Orcinol (valor de R_f de 0,45). A fração F2', assim como antígenos solúveis em solvente aquoso (S), não apresentaram produto corado.

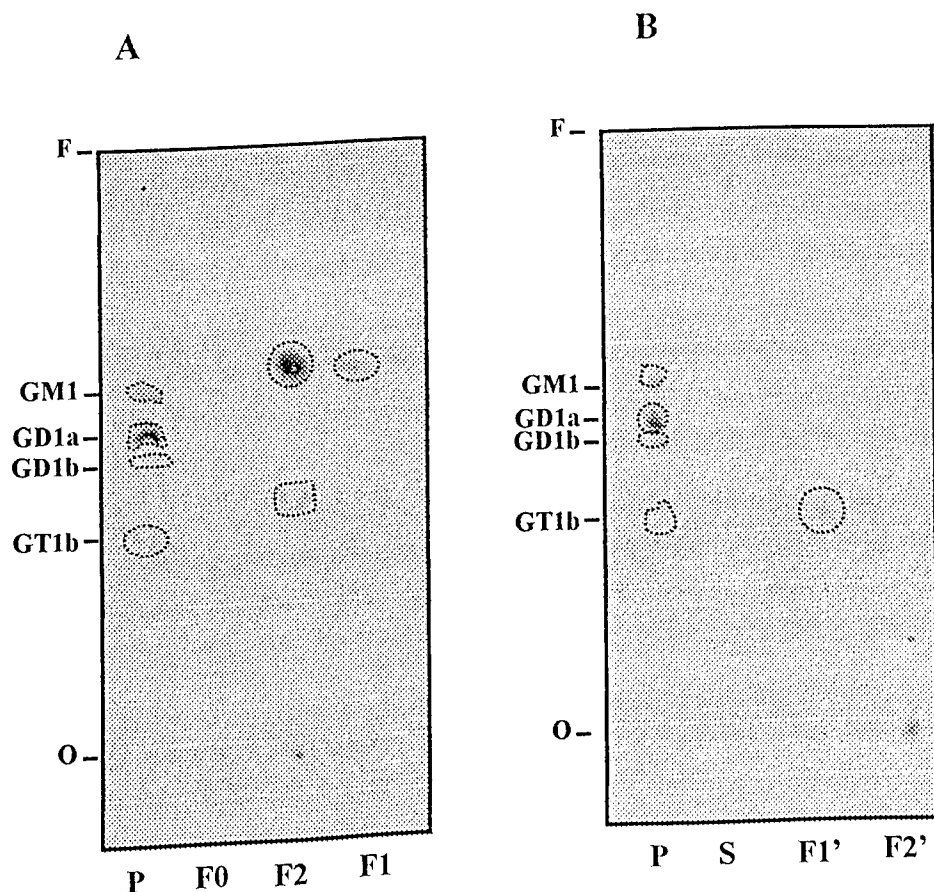


Figura 4: Perfil cromatográfico, em camada delgada, das frações de membrana de taquizoítos de *T. gondii*. Foram aplicados 10 μ L de amostras diluídas em isopropanol a 60% (alíquotas de $2,5 \times 10^7$ parasita equivalentes/mL) no ponto de partida da placa, ou origem (O). Uma mistura de quatro gangliosídeos (10 μ g: GM1 a 21%, GD1a a 40%, GD1b a 16% e GT1b a 19%) foi utilizada como padrão (P) de corrida. GM1: monosialotetraesoxilgangliosídeo; GD1a e GD1b: disialotetraesoxilgangliosídeo; GT1b: trisialotetraesoxilgangliosídeo. S: antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii*. O ponto final da corrida foi chamado de F.

4.3. Produção de NO por células J774 incubadas com frações de *T. gondii*, com diferentes graus de hidrofobicidade

Para analisar a influência das diferentes frações obtidas de *T. gondii* sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos da linhagem J774, as células foram tratadas em cultura por 48 horas com frações F1', F2' e F3', oriundas de taquizoítos de cultura celular ou de líquido da cavidade peritoneal de camundongos (figura 5). Qualquer que seja a fonte de taquizoítos, tanto a fração F1' quanto F2' estimularam as células J774 para produzirem óxido nítrico. Entretanto, F2' tem maior efeito sobre estas células quando proveniente de taquizoítos de cultura de fibroblastos, ao contrário de F1', que estimulou melhor os macrófagos quanto vindo de taquizoítos do lavado peritoneal de camundongos ($18,11 \pm 5,7 \mu\text{M}$) do que de cultura ($8,48 \pm 0,2 \mu\text{M}$).

A fração F3' apenas foi capaz de estimular as células quando provenientes de cultura celular. Nesta condição, F3' conseguiu induzir a produção de óxido nítrico por células J774 a níveis comparáveis a F1' ($F1' = 8,48 \pm 0,2 \mu\text{M}$; $F3' = 8,07 \pm 4,02 \mu\text{M}$), mas não a F2' ($33,05 \pm 4,7 \mu\text{M}$) ou LPS +IFN- γ ($26,37 \pm 3,8 \mu\text{M}$).

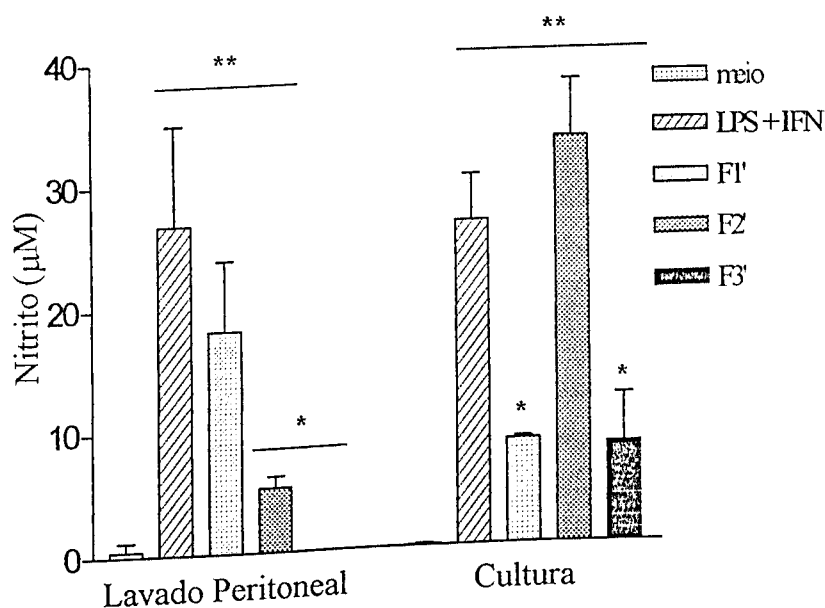


Figura 5: Óxido nítrico em sobrenadante de células J774 após adição de diferentes frações de *T. gondii* obtidas de taquizoítos de lavado peritoneal de camundongos e de fibroblastos em cultura. As células foram estimuladas em cultura, em placas de 96 poços, por 48 horas. **Meio**: somente meio de cultura. **F1'**: fração mais hidrofóbica adicionada a 200 µl de RPMI ($2,5 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL). **F2'**: hidrofobicidade intermediária ($5,0 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL). **F3'**: fração mais hidrofílica ($5,0 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL). **LPS**: lipopolissacáride (10 µg/mL). **IFN**: interferon- γ (1 ng/mL). Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. As diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle (**) foram consideradas significativas para $p < 0,05$. As diferenças entre tratamento das células com frações de *T. gondii* e com LPS + IFN- γ (*) também foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

4.4. Estudo comparativo das frações F1' e F2', tratadas pelo calor, quanto à capacidade de induzirem NO

Dependendo da natureza da molécula, o aquecimento pode inibir ou destruir suas propriedades biológicas. Moléculas de origem protéica, por exemplo, desnaturam em temperaturas superiores a 56°C, enquanto que moléculas constituídas de um grupo lipídico, como o LPS, são termoestáveis. Para testar a natureza das moléculas presentes nas frações, que foram capazes de ativar os macrófagos, células foram incubadas com LPS, F1' e F2' após aquecimento a 95°C (figura 6). LPS, F1' e F2' aquecidos não perderam capacidade estimulatória de células J774, ao contrário de IFN- γ que após aquecido perdeu a capacidade de estimular as células (sem aquecimento: $13,74 \pm 7,18 \mu\text{M}$; após aquecimento: $2,0 \pm 2,4 \mu\text{M}$), equivalendo-se ao controle ($p < 0,05$). A produção de óxido nítrico por células estimuladas com IFN- γ sozinho é comparável aquela induzida por F1' ($18,11 \pm 5,7 \mu\text{M}$), não aquecidos, e ambos levam a estímulos significativamente menores que LPS + IFN- γ e F2' ($p < 0,05$). Após o tratamento com LPS + IFN- γ aquecidos, a produção de NO não foi significativamente diferente do que o mesmo tratamento sem aquecimento. Entretanto, nota-se uma tendência à diminuição da produção de óxido nítrico no grupo tratado com LPS + IFN- γ aquecido, cujos valores ($14,69 \pm 12,34 \mu\text{M}$) são semelhantes aos do grupo tratado com LPS aquecido ($16,99 \pm 15,91 \mu\text{M}$).

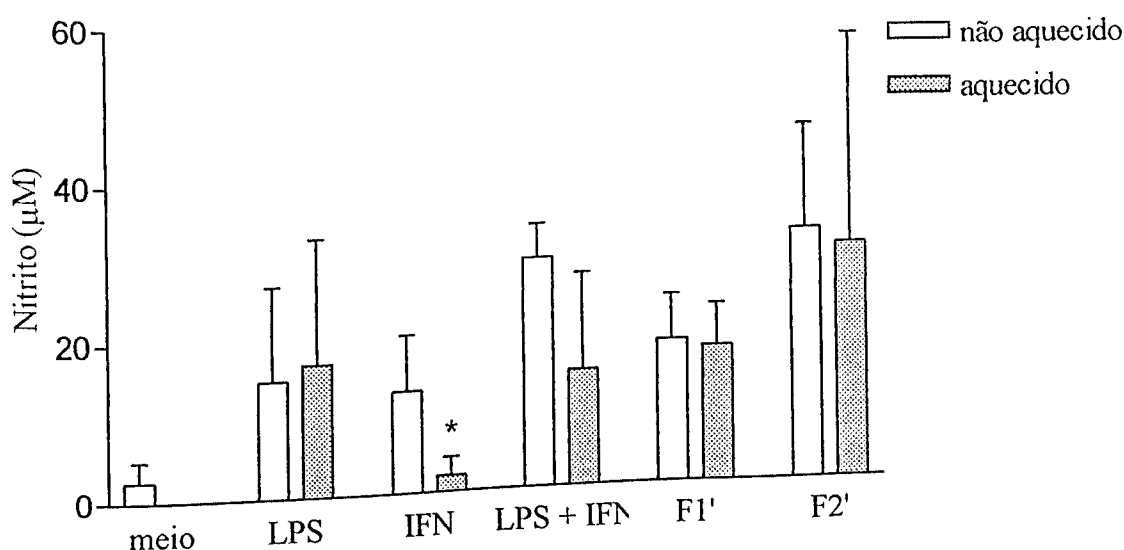


Figura 6: Óxido nítrico em sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS, IFN- γ e frações de *T. gondii* de taquizoítos de lavado peritoneal (F1') e de cultura (F2') após aquecimento. As células foram estimuladas por 48 horas com LPS, IFN- γ , F1' e F2', pré-aquecidos ou não a 95°C por 5 minutos. **Meio:** nenhum estímulo foi adicionado. **F1':** fração mais hidrofóbica adicionada a 200 μ l de RPMI por poço ($2,5 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL). **F2':** fração intermediária adicionada a 200 μ L de RPMI por poço ($2,5 \times 10^7$ parasita-equivalentes/mL). **LPS:** lipopolissacáride (5 μ g/mL). **IFN:** interferon- γ (1 10^7 parasita-equivalentes/mL). Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$ em (*) e representam a comparação entre grupos estimulados com IFN- γ e IFN- γ previamente aquecido, respectivamente. O resultados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

4.5. Curva dose-resposta da produção de NO por macrófagos J774 estimulados com diferentes concentrações de F1' e F2'

A fim de verificar se a capacidade estimulatória das frações de *T. gondii* sobre macrófagos J774 é dose-dependente, as células foram tratadas com diferentes volumes de alíquotas de F1' e F2' (figura 7). Concentrações crescentes de F1' e de F2' levam a um aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos J774. Embora as curvas de dose-dependência destas duas frações apresentem perfis diferentes, ambas levam a uma produção semelhante de óxido nítrico na concentração de 5×10^7 parasita equivalentes/mL (F1': $29,56 \pm 7,47$ μM ; F2': $33,05 \pm 4,74$ μM).

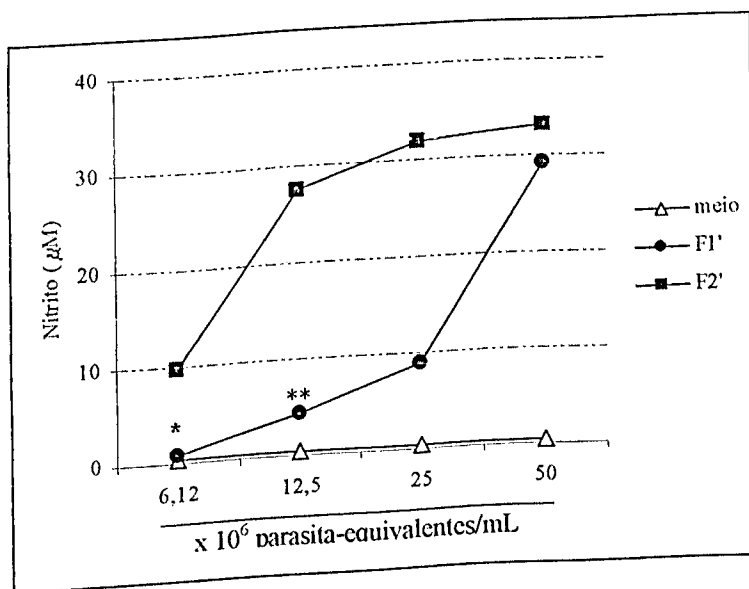


Figura 7: Curva dose-resposta da produção de óxido nítrico induzida pelas frações F1' e F2' de *T. gondii*. Após 48 horas de tratamento de macrófagos J774 com F1' e F2' ($6,12 - 50 \times 10^6$ parasita-equivalentes/ml de cada fração) o sobrenadante foi coletado para determinação de óxido nítrico pelo método de Griess. As frações foram obtidas de taquizoítos mantidos em cultura de fibroblastos (HFF). (*) e (**) representam valores para F1' significativamente menores que F2' ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). O resultados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

4.6. Relação entre a hidrofobicidade e a ação estimulatória das frações de *T. gondii* sobre a produção de NO por células J774

Para a obtenção de frações de *T. gondii* com diferentes graus de hidrofobicidade, foram utilizados dois protocolos, que deram origem a seis diferentes frações. As frações F1', F2' e F3' são obtidas segundo Giraldo et al (2000) e entre elas a fração F1' é a mais hidrofóbica. Na figura 8 A pode ser observada uma maior produção de óxido nítrico por F1', quando comparadas às frações menos hidrofóbicas ($p < 0,05$). Este protocolo pode ser modificado e gerar as frações F0, F1 e F2, onde F0 é a fração mais hidrofóbica. Da mesma forma, esta fração contribui para uma maior produção de óxido nítrico do que as outras frações (figura 8 B), ou seja, as frações mais hidrofóbicas (F0 e F1') possuem maior capacidade de estimular as células J774 para produção de óxido nítrico. Após tratamento por 48 horas e coleta de sobrenadante para determinação de NO, a viabilidade celular foi testada pelo método MTT. Células tratadas com LPS+IFN- γ ou frações apresentaram viabilidade de 100% em relação ao controle.

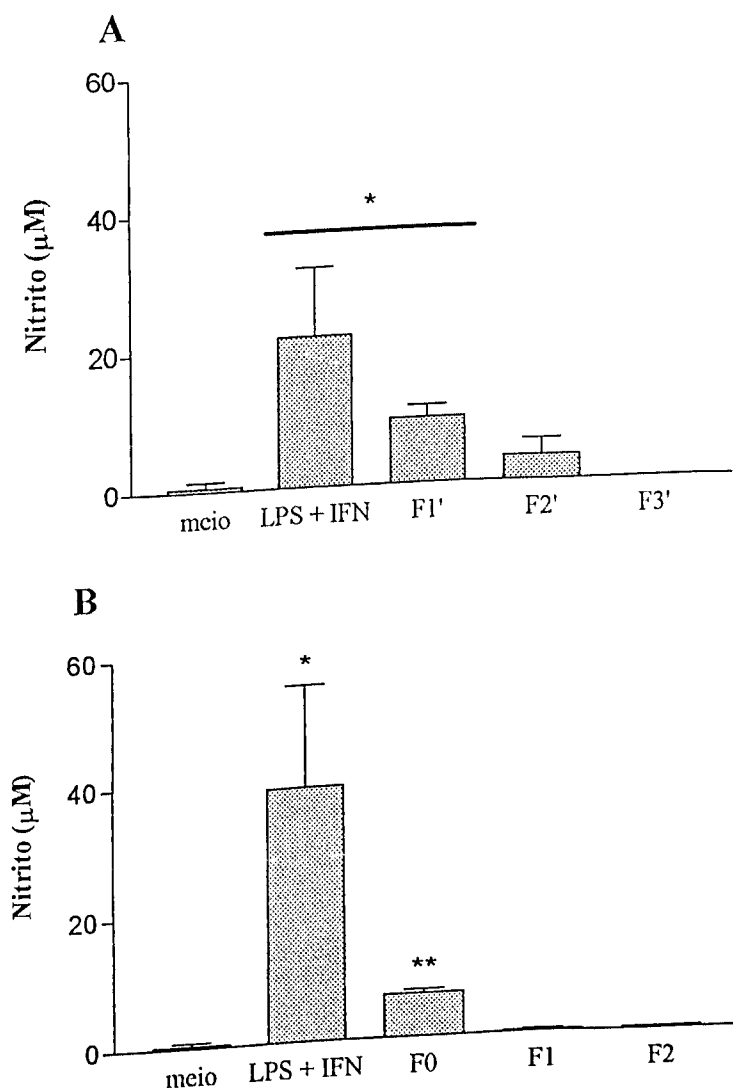


Figura 8. Efeito do grau de hidrofobicidade das frações de *T. gondii* sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774. Após 48 horas de tratamento de macrófagos com F1', F2' e F3' (A), ou com F0, F1 e F2 (B), o sobrenadante foi coletado para determinação de óxido nítrico pelo método de Griess. As frações (5×10^7 parasita equivalentes/ mL) foram obtidas de taquizoítos recuperados de líquido peritoneal de camundongos Swiss. O meio RPMI foi usado como controle negativo e LPS + IFN- γ como controle positivo. O resultados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. (*) e (**) representam valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), respectivamente.

4.7. Tratamento de macrófagos J774 em cultura com anticorpos anti-TLR2 concomitante ao tratamento com frações de *T. gondii*

Como já mostrado nos resultados anteriores, as frações obtidas de taquizoítos estimulam a produção de NO por macrófagos de maneira dependente da hidrofobicidade. A figura 9 mostra que F0, F1', F2' e F3' de lavado peritoneal ou de cultura celular (em células tratadas com isotipo IgG2a) estimulam a produção de NO por macrófagos J774 e que o tratamento com anticorpos anti-TLR2 não levou a alteração significativa da produção de NO para nenhum dos grupos ($p > 0,05$), embora possa ser observada uma tendência a uma redução parcial da produção para o grupo F1', tanto no caso de taquizoítos provenientes de cultura celular (figura 9 A), quanto de lavado peritoneal (figura 9 B). O controle negativo para este tratamento (LPS + IFN- γ) não apresentou diminuição na produção de NO (figura 9C), enquanto que o controle positivo (lisado total de *S. aureus*) apresentou diminuição de 50% na produção de NO após tratamento com anti-TLR2.

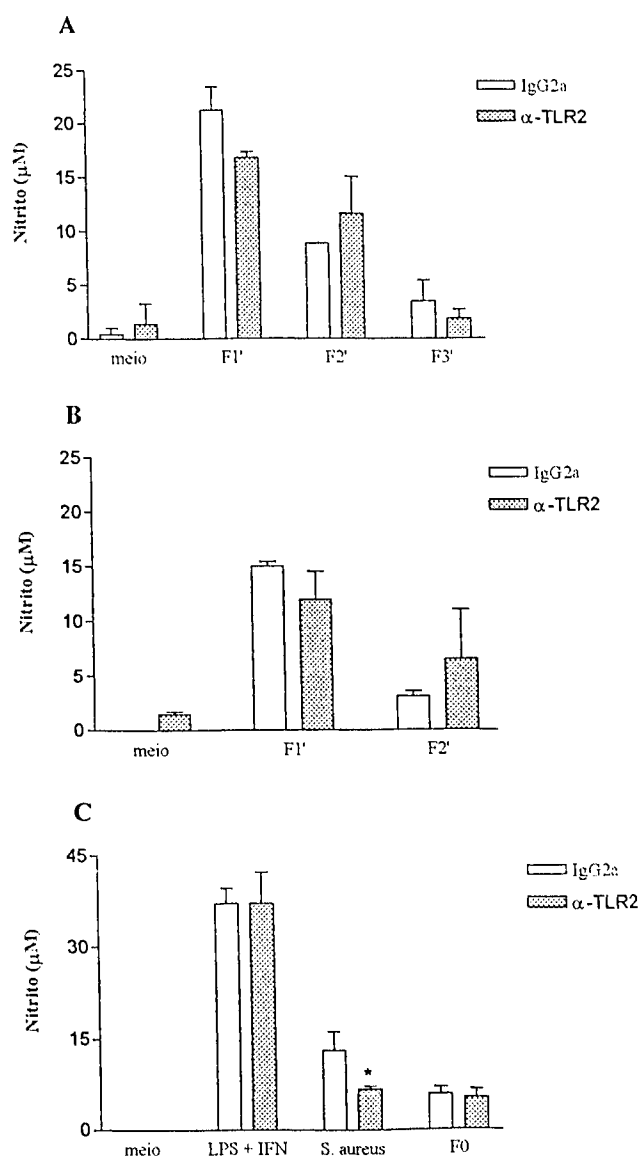


Figura 9: Efeito de anticorpos anti-TLR2 na produção de óxido nítrico por macrófagos J774 tratados com frações de *T. gondii*. Após 48 horas de tratamento de macrófagos com F1', F2' e F3', na presença ou ausência de anti-TLR-2, o sobrenadante foi coletado para determinação de NO. As frações ($2,5 \times 10^6$ parasita equivalentes/ 200 μ L) foram obtidas de taquizoítos de fibroblastos humanos em cultura (A) ou de líquido peritoneal de camundongos Swiss (1×10^6 parasita equivalentes/ 200 μ L) (B). O meio RPMI foi usado como controle negativo e IgG2a murino foi usado como isotipo controle para anti-TLR2. O tratamento LPS + IFN- γ foi utilizado como controle negativo e o tratamento com lisado total de *S. aureus* foi utilizado como controle positivo.

4.8. Ação inibitória de extrato etanólico de *Serjania lethalis* sobre a produção de NO por macrófagos J774

Extratos de três plantas utilizadas em medicina popular, que possuem ação anti-inflamatória, foram analisados em cultura de macrófagos J774 estimulados com LPS + IFN- γ quanto ao efeito inibitório na produção de óxido nítrico por estas células (tabela 1). As diferentes partes das plantas geraram extratos com diferentes efeitos, tanto em relação à inibição do óxido nítrico quanto de citotoxicidade. Dentre todos os extratos testados, aquele que apresentou uma maior porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico e menor efeito tóxico (maior IC₅₀) foi o extrato etanólico de casca do caule de *Serjania lethalis*.

Tabela 1. Espécies de plantas investigadas, usos tradicionais, rendimento da extração (w/w), porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico e citotoxicidade dos extratos.

Família, nome científico	Indicações e usos tradicionais	Partes das plantas e solventes	Rendimento (%)	Inibição da produção de NO (%)	Toxicidade (IC ₅₀ , µg/mL)
Flacourtiaceae					
<i>Casearia sylvestris</i> SW. var. <i>lingua</i> (Camb.) Eichl.	Anti-inflamatório, anti-térmico, anti-microbiano, anti-sifilítico e anti-ofídico	F, E	4,91	0	113,6 ± 6,6
		MC, E	11,02	0	124,2 ± 2,2
		MC, H	1,24	94,4 ± 7,2*	17,6 ± 1,5**
		CC, E	14,97	0	149,6 ± 16,0
		MR, E	2,27	16,4 ± 19,9	113,3 ± 17,2
		CR, E	4,23	0	32,3 ± 1,6**
		CR, H	2,25	97,1 ± 5,4*	18,0 ± 2,0**
Sapindaceae					
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Anti-inflamatório, anti-térmico, tônico	F, E	6,79	95,74 ± 6,1	117,2 ± 15,5
		MC, E	3,78	0	66,5 ± 1,7
		CC, E	6,15	0	160,0 ± 20,1
<i>Serjania lethalis</i> A. St. Hil.	Anti-inflamatório, analgésioic (uso externo) e pesticida	F, E	17,94	32,2 ± 34,1	149,8 ± 15,0
		MC, E	9,74	69,8 ± 24,2*	205,1 ± 86,2
		CC, E	3,2	97,4 ± 4,4*	151,8 ± 58,4
		CR, E	2,56	0	42,7 ± 1,6**

Os resultados representam as médias de três experimentos independentes ± SD.

Solventes utilizados na extração - H: hexano; E: etanol.

Partes das plantas - F: folha; MC: madeira do caule; CC: casca do caule; MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz.

* $p < 0,01$: níveis significantes quando comparados ao grupo controle.

** $p < 0,02$: IC₅₀ significativamente menor que o controle.

4.9. Efeito de extrato etanólico de *Serjania lethalis* sobre a produção de NO por macrófagos J774 estimulados com F0.

Como visto anteriormente (tabela 1) o extrato etanólico de casca do caule de *S. lethalis* é capaz de inibir quase 100% do efeito de LPS + IFN- γ sobre a produção de óxido nítrico por células J774. Entretanto, este extrato não altera o efeito de F0 sobre a produção de óxido nítrico (figura 10), já que o tratamento concomitante de células com F0 e o extrato levou à produção de níveis de NO semelhantes aos de células tratadas apenas com F0.

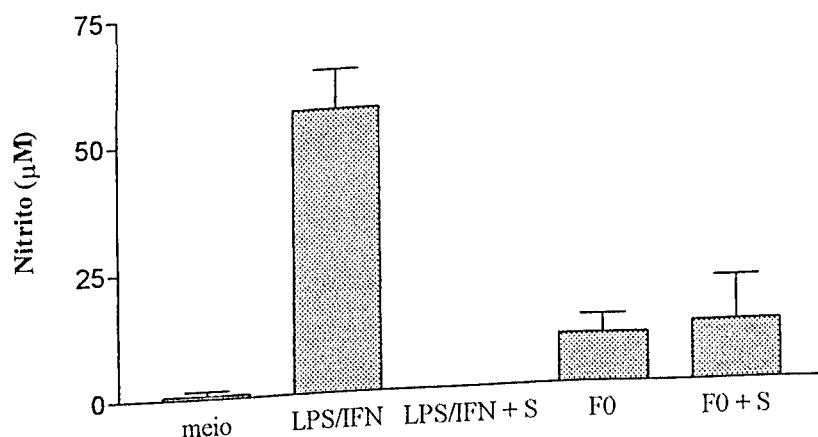
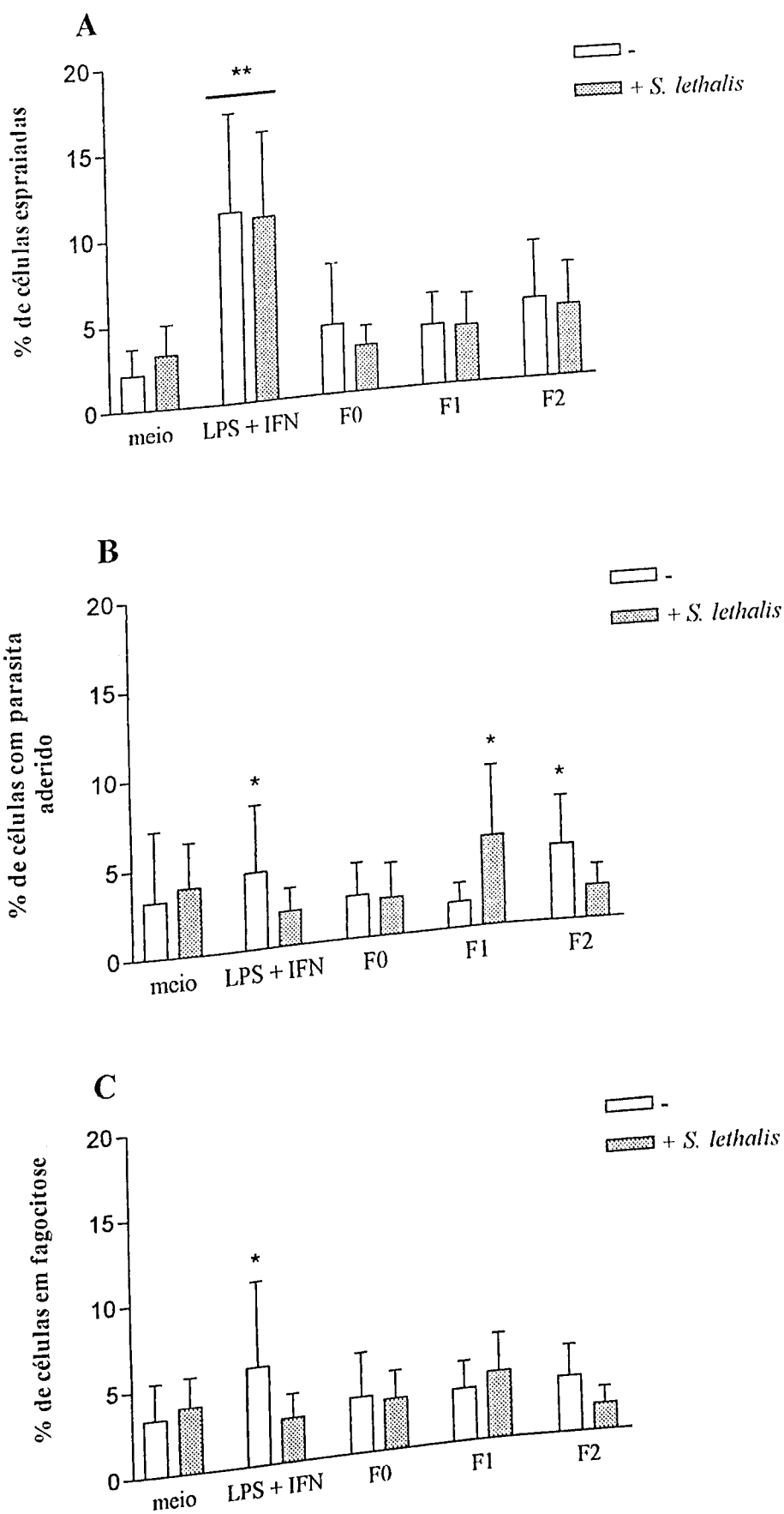


Figura 10. Produção de óxido nítrico por macrófagos J774 tratados com LPS + IFN- γ , fração F0 ou F0 com extrato de *Serjania lethalis*. Após 48 horas de tratamento de macrófagos com LPS + IFN- γ , F0 ou F0 + *S. lethalis* (extrato etanólico da casaca do caule da planta), o sobrenadante foi coletado para determinação de óxido nítrico pelo método de Griess. As frações (5×10^7 parasita equivalentes/ mL) foram obtidas de taquizoítos de RH recuperados de líquido peritoneal de camundongos Swiss. O meio RPMI foi usado como controle. O resultados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

4.10. Efeito de frações de *T. gondii* e do extrato etanólico de *S. lethalis* sobre a fagocitose de taquizoítos mortos pelo calor

Como mostrado na figura anterior, o extrato etanólico da casca do caule de *S. lethalis* não foi capaz de alterar a capacidade estimulatória de F0. Seu efeito foi também testado no espraçamento de macrófagos J774, adesão a taquizoítos e fagocitose em células estimuladas com LPS + IFN- γ , F0, F1 e F2 (figura 11). Estes estímulos adicionados sozinhos ou concomitantemente ao extrato de *S. lethalis* levaram a porcentagens semelhantes de espraçamento, adesão ou fagocitose, quando comparando os pares. Em relação ao controle, apenas LPS + IFN- γ foi capaz de aumentar o número de células espraçadas ($p < 0,01$). Também com relação ao controle, houve um aumento de células com parasito aderido nos grupos F2, LPS + IFN- γ e F1 + *S. lethalis* ($p < 0,05$). A fagocitose de taquizoítos de *T. gondii* sofreu influência apenas do tratamento com LPS + IFN- γ , que levou a um aumento da porcentagem de células com parasitas fagocitados, quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Já o tratamento com LPS + IFN- γ + *S. lethalis* levou uma porcentagem de fagocitose comparável ao grupo controle.

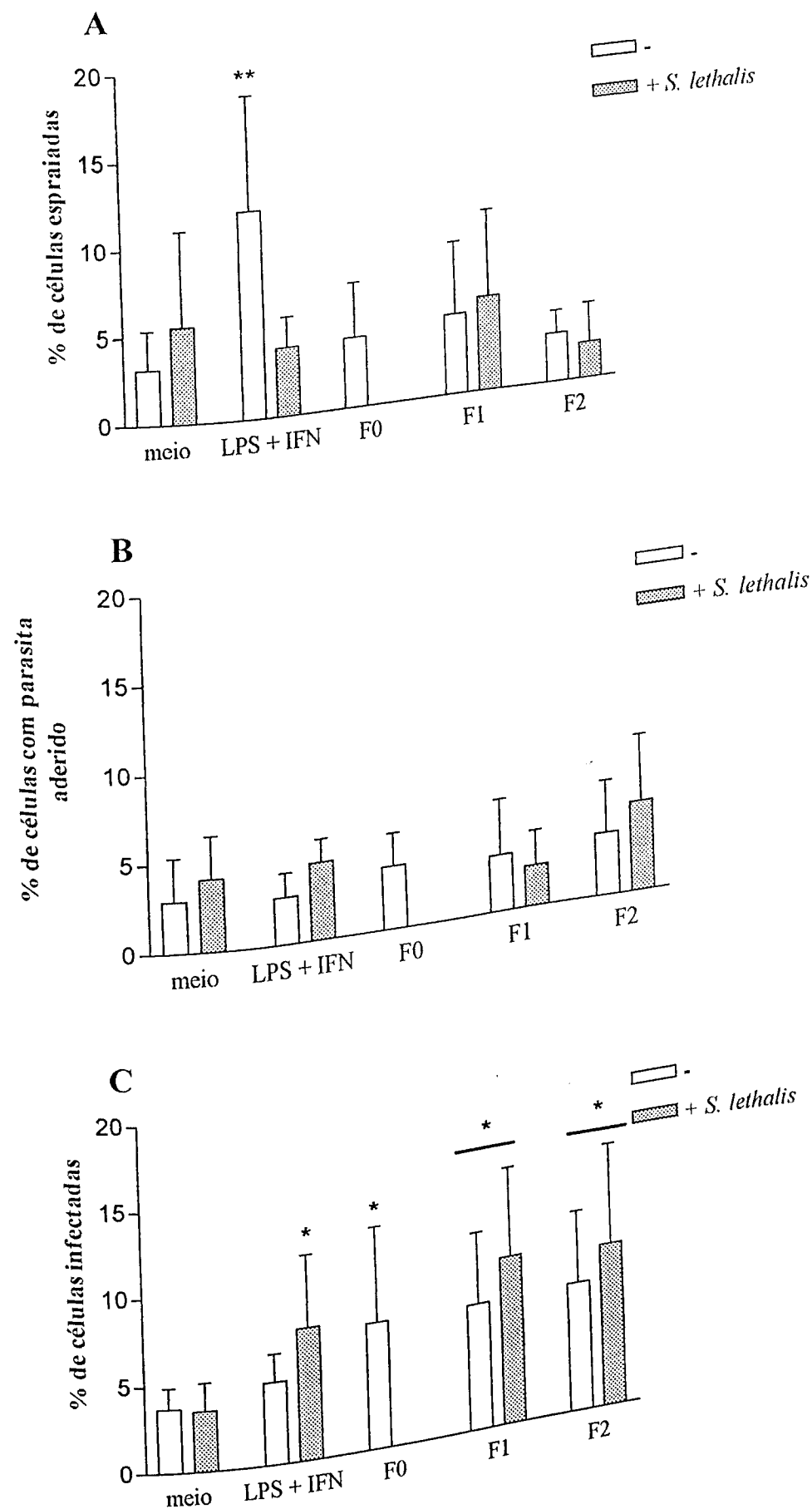
Figura 11. Espraiamento, adesão e fagocitose de macrófagos J774 tratados com LPS + IFN- γ ou frações de *T. gondii*, na presença ou ausência de extrato de *S. lethalis*. Após 48 horas de tratamento de macrófagos com LPS + IFN- γ , Frações ou Frações + *S. lethalis*, as células foram fixadas e coradas com Giemsa. As frações (5×10^7 parasita equivalentes/mL) foram obtidas de taquizoítos de RH recuperados de líquido peritoneal de camundongos Swiss. Após o tratamento, as células foram incubadas por 24 horas com taquizoítos mortos (aquecidos por 1 hora a 56°C). O meio RPMI foi usado como controle. (*) e (**) representam valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).



4.11. Efeito de frações de *T. gondii* e de extrato etanólico de *S. lethalis* sobre o espraçamento, adesão e infecção de macrófagos J774 pelo parasito

O efeito de extrato etanólico da casca do caule de *S. lethalis* foi também testado na invasão de macrófagos J774 por taquizoitos de *T. gondii* (figura 12). Ao analisarmos novamente o espraçamento, apenas o grupo tratado com LPS + IFN- γ apresentou um número maior de células espraçadas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). Em relação à infecção das células pelo parasito, os grupo tratados com LPS + IFN- γ + *S. lethalis*, F0, F1, F1+ *S. lethalis*, F2 e F2 + *S. lethalis* apresentaram um porcentagem maior de células infectadas ($p < 0,05$). Mesmo sendo significativas as diferenças observadas, as porcentagens de invasão podem ser consideradas baixas para todos os grupos (inferiores a 10%).

Figura 12. Espreadimento, adesão e invasão de macrófagos J774 tratados com LPS + IFN- γ ou frações de *T. gondii*, na presença ou ausência de extrato de *S. lethalis*. Após 48 horas de tratamento de macrófagos com LPS + IFN- γ , Frações ou Frações + *S. lethalis*, as células foram fixadas e coradas com Giemsa. As frações (5×10^7 parasita equivalentes/mL) foram obtidas de taquizoítos de RH recuperados de líquido peritoneal de camundongos Swiss. O meio RPMI foi usado como controle. (*) e (**) representam valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).



4.12. Efeito de frações de *T. gondii* sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais residentes e inflamatórios de camundongos C57BL/6

Além dos macrófagos J774, outros macrófagos murinos foram analisados quanto ao efeito estimulatório das frações de *T. gondii* sobre produção de NO e quanto à interação com o parasito. Quanto ao estímulo de macrófagos peritoneais murinos para a produção de óxido nítrico, células de camundongos C57BL/6 eliciados com tioglicolato responderam de maneira semelhante aos macrófagos J774 (figura 13). Ao contrário, macrófagos residentes produziram níveis de óxido nítrico sem diferença significativa entre os grupos.

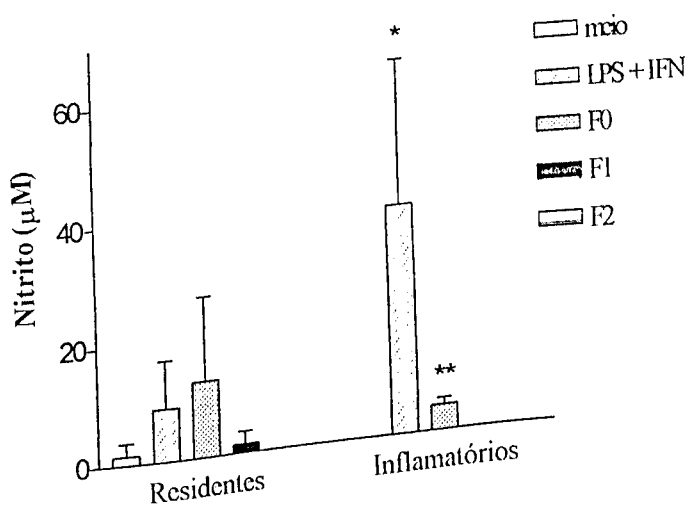


Figura 13. Produção de óxido nítrico por macrófagos residentes e inflamatórios de camundongos C57BL/6. Após 48 horas de tratamento de macrófagos com LPS + IFN- γ , F0, F1 e F2, o sobrenadante foi coletado para determinação de óxido nítrico pelo método de Griess. As frações (5×10^7 parasita equivalentes/ mL) foram obtidas de taquizoítos de RH recuperados de líquido peritoneal de camundongos Swiss. O meio RPMI foi usado como controle. O resultados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. (*) e (**) representam valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

4.13. Comparação entre macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 e BALB/c e macrófagos da linhagem J774, quanto à produção de NO, espraçamento, adesão e infecção, durante infecção por *T. gondii*

Para analisar a influência das frações de *T. gondii* na produção de óxido nítrico por macrófagos inflamatórios de camundongos C57BL/6 e BALB/c, durante interação com o parasito, as células foram tratadas 24 horas antes da infecção. Como observado na figura 14, o tratamento dos macrófagos murinos com frações de *T. gondii* foi capaz de aumentar a produção de óxido nítrico após 24 horas de tratamento. Além disso, os níveis de óxido nítrico produzidos nos grupos tratados com frações foram comparáveis aos dos grupos tratados com LPS + IFN- γ (figura 14 A), ou até maiores, como no caso de células provenientes de camundongos BALB/c (figura 14 C).

Após a infecção de ambos os tipos celulares (48 h), algumas diferenças na produção de óxido nítrico podem ser notadas. Macrófagos de camundongos BALB/c tratados com F0 e F1 produziram níveis de óxido nítrico significativamente reduzidos em relação a 24 horas antes da infecção (figura 14 C). Ao contrário, macrófagos de camundongos C57BL/6 foram capazes de manter (LPS + IFN, F0 e F2), ou mesmo aumentar (F1, $p < 0,01$) a produção de óxido nítrico após infecção (figura 14 A).

O tratamento com extrato de *S. lethalis* foi capaz de reduzir a produção de óxido por macrófagos de C57BL/6 e de BALB/c tratados com LPS + IFN- γ (figuras 14 B e D), tanto antes quanto após a infecção. O mesmo pode ser observado com relação à fração F2. As demais frações mantêm o mesmo comportamento na presença ou ausência de extrato de *S. lethalis*. A viabilidade celular foi 100% em qualquer tratamento (teste MTT).

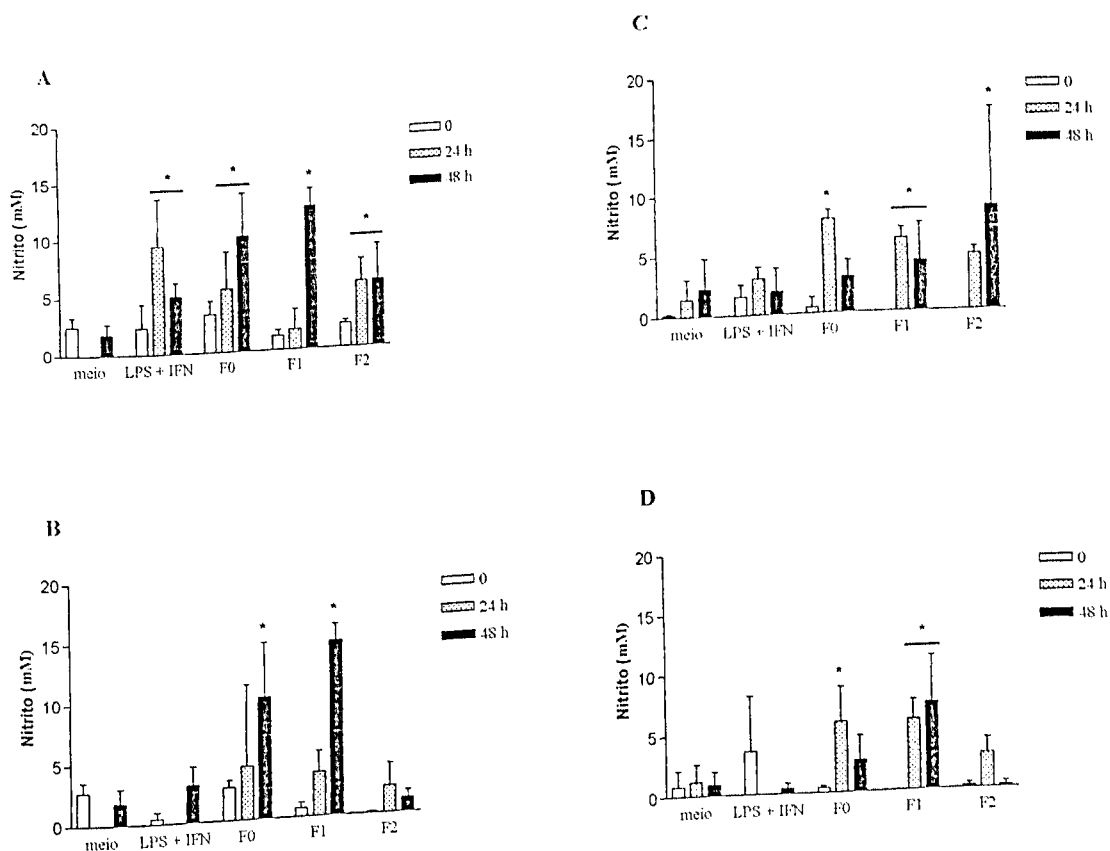


Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 e BALB/c tratados com LPS + IFN- γ e frações de *T. gondii*. Macrófagos de C57BL/6 foram tratados *in vitro* por 24 horas antes da infecção com taquizoítos de *T. gondii*, na ausência (A) ou na presença de extrato de *S. lethalis* (B). Paralelamente, macrófagos de BALB/c foram também tratados por 24 horas antes da infecção com taquizoítos de *T. gondii*, na ausência (C) ou na presença de extrato de *S. lethalis* (D). Após 24 horas de tratamento as células foram infectadas com *T. gondii* (razão taquizoíto/células = 5:1), mantendo-se o tratamento por mais 24 horas. Sobrenadantes foram coletados nos tempos 0 (sem tratamento), 24 h (após tratamento) e 48 h (24 h de infecção e 48 h de tratamento). (*) representa valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$).

Como visto em resultados anteriores, macrófagos J774 tratados com LPS + IFN- γ se encontram mais espalhados, enquanto que o tratamento com frações de *T. gondii* não influencia este comportamento (figuras 11 e 12). Quando os macrófagos inflamatórios de camundongos C57BL/6 e BALB/c são analisados, nota-se que a porcentagem de espalhamento em todos os grupos encontra-se ligeiramente superior quando comparadas a células J774 (figura 15A). Além disso alguns tratamentos, como LPS + IFN- γ em macrófagos de C57BL/6, são capazes de aumentar ainda mais o número de células espalhadas (figuras 15 A).

Para investigar a relevância do tratamento prévio dos macrófagos murinos com frações de *T. gondii* na adesão ao parasito, a porcentagem de células com taquizoítos aderidos foi avaliada. Em relação a camundongos C57BL/6, nenhum tratamento de macrófagos aumentou a porcentagem de adesão ao parasito, exceto LPS + IFN- γ (figura 15 B). O tratamento de macrófagos de camundongos BALB/c com F0 levou a uma diminuição da adesão em relação a células não tratadas ($p < 0,05$).

Em relação à infecção de macrófagos por *T. gondii*, células de camundongos BALB/c apresentaram uma maior porcentagem de infecção que células J774 e de camundongos C57BL/6 (comparação entre células incubadas apenas com meio). Podemos notar ainda na figura 15 C que o tratamento de macrófagos de camundongos BALB/c com F0 diminuiu a porcentagem de infecção, quando comparado com células incubadas apenas com meio.

Se compararmos o efeito de F0 sobre a adesão e a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c (figura 16), podemos notar que diminuições significativas, tanto da adesão quanto da infecção, ocorreram quando as células foram tratadas com a fração F0 (figura 16 A) e quando os taquizoítos foram tratados com F0 (figura 16 B).

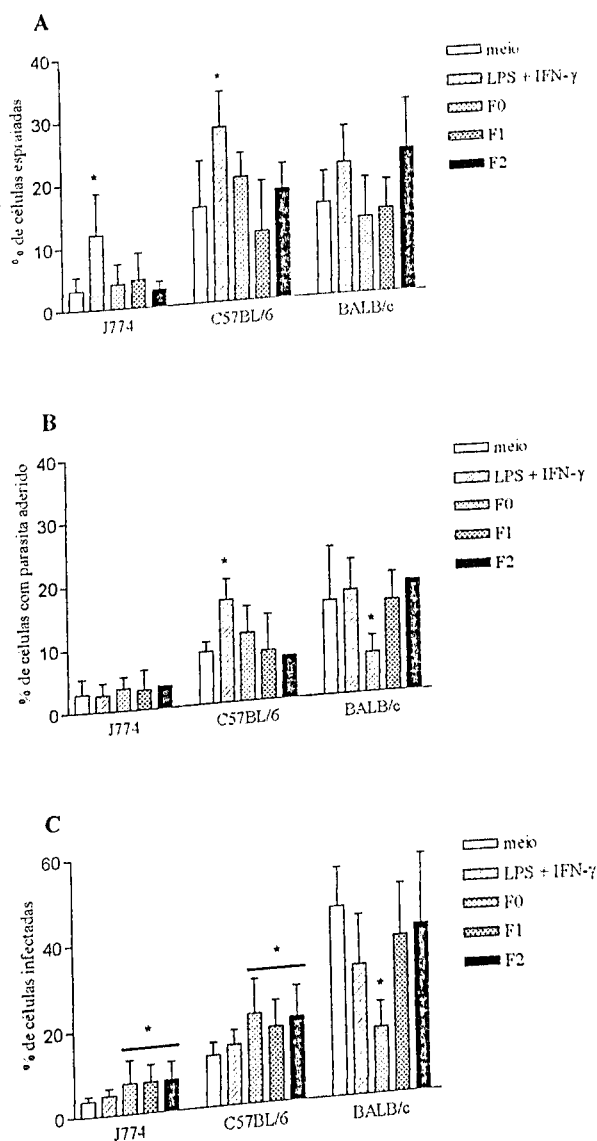


Figura 15. Diferenças no espriamento de macrófagos peritoneais e de linhagem J774 infectados com *T. gondii*. Macrófagos peritoneais inflamatórios foram coletados no 4º dia após injeção i.p. de 1 mL de tioglicolato a 3%, e cultivados por 24 horas em RPMI com 5% de SBF, assim como macrófagos J774 mantidos em cultura. As células foram tratadas por 24 horas com LPS + IFN- γ e frações e infectadas com *T. gondii* (razão taquizoito/células = 5:1) por mais 24 horas. O número de células espalhadas, com parasitos aderidos ou infectadas foi determinado por análise em microscópio óptico. As diferenças significativas (*), relativas aos macrófagos não tratados ($p < 0,05$), estão indicadas.

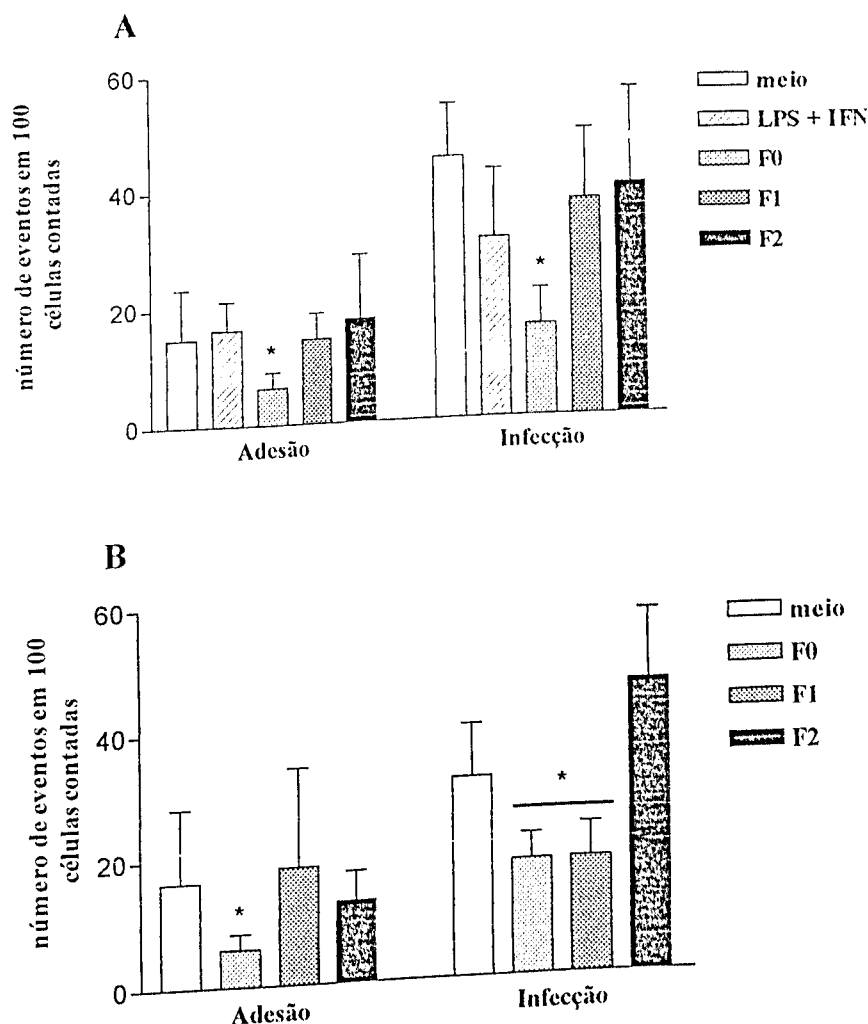


Figura 16. Diferenças na adesão e infecção por *T. gondii* em macrófagos de camundongos BALB/c. Macrófagos peritoneais inflamatórios foram recuperados no 4º dia após injeção i.p. de 1 mL de tioglicolato a 3%, e cultivados por 24 horas em RPMI com 5% de SBF. As células (A) ou os taquizoítos (B) foram tratadas por 24 horas com frações de *T. gondii* e infectadas (razão taquizoíto/células = 5:1) por mais 24 horas. As diferenças significativas (*), relativas aos macrófagos não tratados ($p < 0,05$), estão indicadas. (#) é a diferença em relação aos macrófagos tratados apenas com *S. lethalis* (controle), e representa valores de $p < 0,05$.

Como mostrado anteriormente o tratamento concomitante de macrófagos J774 com extrato de *S. lethalis* e LPS + IFN- γ (tabela 1) foi capaz de reduzir drasticamente a produção de NO. A figura 17 A mostra que este tratamento também é capaz de interferir na infecção destas células por *T. gondii*. Células tratadas com LPS + IFN- γ + *S. lethalis* foram significativamente mais infectadas do que células tratadas apenas com LPS + IFN- γ ($p < 0,05$). Ao contrário, em macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c, o tratamento com extrato de *S. lethalis* foi capaz de reduzir a infecção nos grupos controle e tratados com LPS + IFN- γ e com frações (figuras 17 B e C). Por exemplo, células de camundongos BALB/c não tratadas apresentaram uma porcentagem de infecção de $44,5 \pm 9,28$, enquanto que células tratadas com o extrato ($26,72 \pm 7,92$) apresentam uma porcentagem reduzida de infecção ($p < 0,01$). Células de camundongos BALB/c tratadas com LPS + IFN- γ , que já apresentam porcentagem de infecção ($30,5 \pm 11,78$) menores que células não tratadas (controle) têm sua porcentagem de infecção mais reduzida ainda ($12,0 \pm 3,39$). Em macrófagos de BALB/c, os grupos de células tratados com F0 apresentaram porcentagens de infecção semelhantes na presença ou ausência de extrato de *S. lethalis* (figuras 17 C).

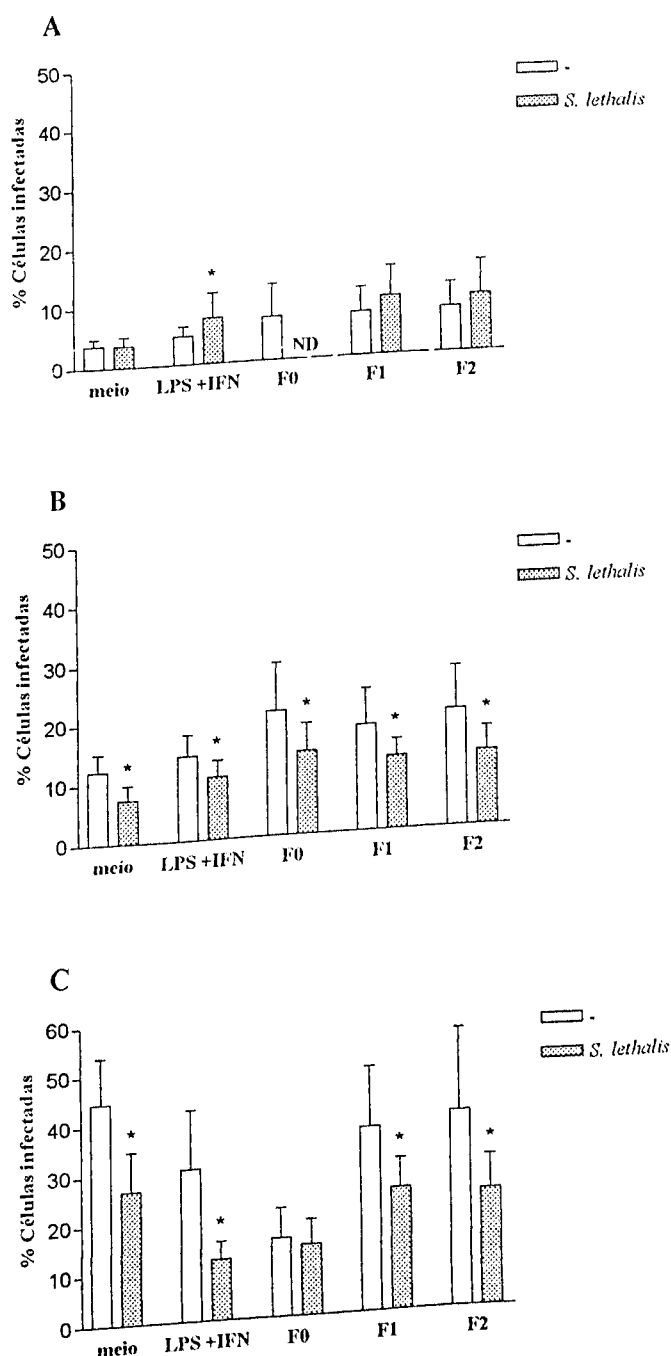


Figura 17. Diferenças na infecção de macrófagos J774 e de camundongos C57BL/6 e BALB/c com *T. gondii*. Células [J774 (A), de C57BL/6 (B) e BALB/c (C)] obtidas como descrito anteriormente foram tratadas por 24 horas na ausência ou na presença de extrato etanólico de *S. lethalis* e infectadas com *T. gondii* (razão taquizoíto/células = 5:1) por mais 24 horas. As diferenças significativas (*), relativas aos macrófagos não tratados ($p < 0,05$), estão indicadas.

As análises morfológicas das três células estudadas revelaram células com citoplasma aumentado, contendo parasitos intracelulares e aderidos. Foram observadas diferenças quanto ao número de eventos analisados, como mostrado nos resultados anteriores.

A figura 18 mostra a aparência dos macrófagos de camundongos C57BL/6 após infecção com *T. gondii* e tratados com LPS + IFN- γ , F0, F1 ou F2.

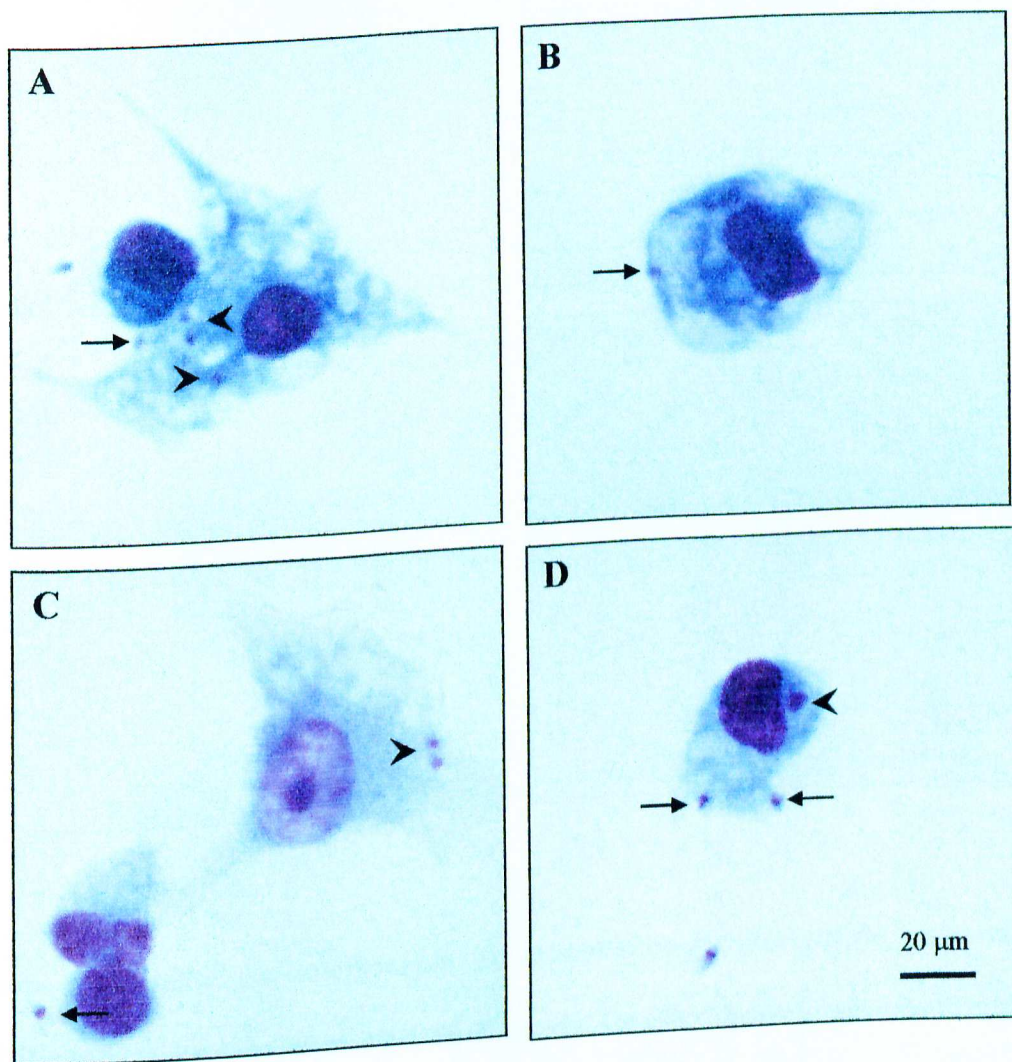


Figura 18. Análise em microscópio de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos de *T. gondii*. Os macrófagos foram estimulados com LPS + IFN- γ (A), F0 (B), F1 (C) e F2 (D) por 24 horas antes da infecção, infectados por 24 horas, fixados e corados com Giemsa. Os taquizoítos aderidos estão apontados por setas pretas e os intracelulares por cabeças de setas.

A figura 19 mostra a aparência dos macrófagos de camundongos BALB/c após infecção com *T. gondii* e tratados com LPS + IFN- γ , F0, F1 ou F2.

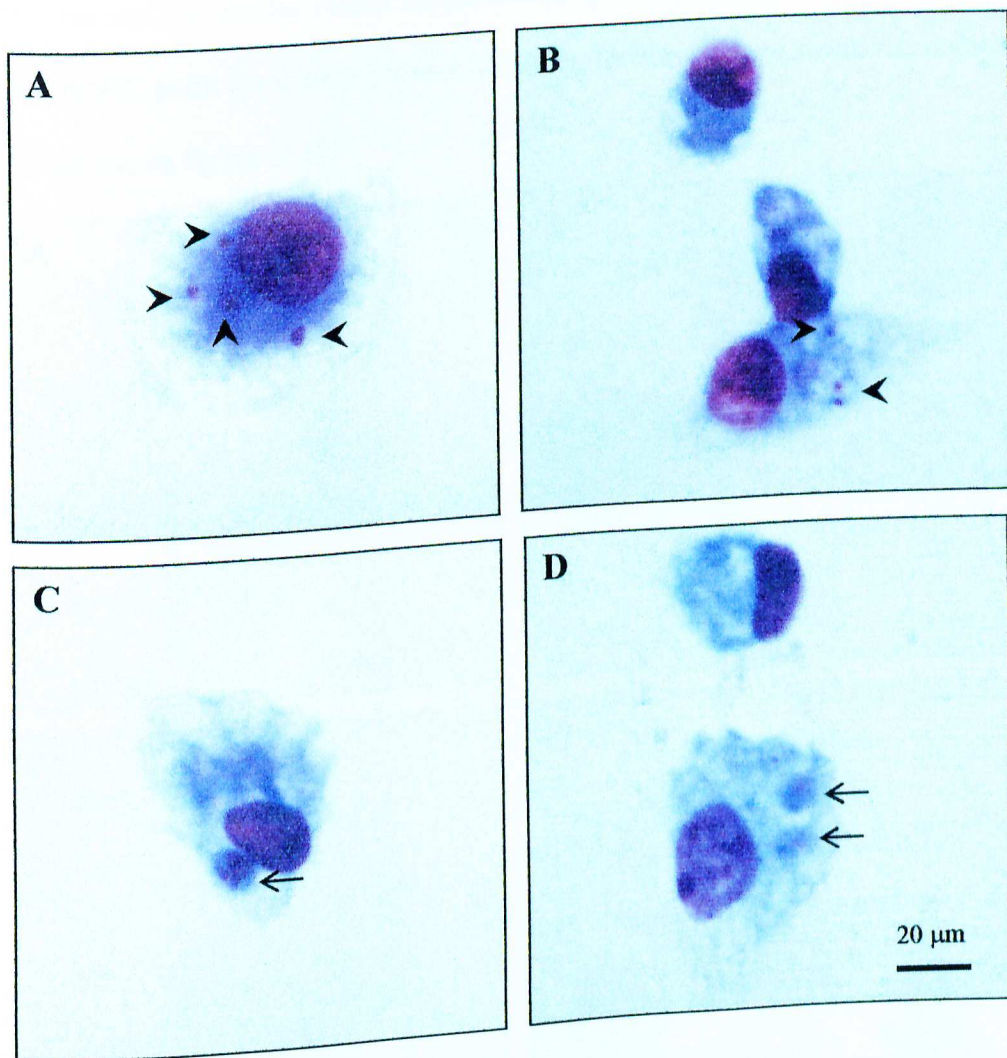


Figura 19. Análise em microscópio de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com taquizoítos de *T. gondii*. Os macrófagos foram estimulados com LPS + IFN- γ (A), F0 (B), F1 (C) e F2 (D) por 24 horas antes da infecção, infectados por 24 horas, fixados e corados com Giemsa. Os vacúolos parasitóforos estão apontados por setas pretas e os intracelulares por cabeças de setas.

A figura 20 mostra a aparência dos macrófagos J774 após infecção com *T. gondii* e não tratados ou tratados com LPS + IFN- γ e F0. Os aspectos morfológicos destas células são semelhantes aos das células vindas de peritônios eliciados, porém ao serem estimuladas pela fração F0, pode apresentar grandes vacúolos (provavelmente devido à fagocitose), como mostrado na figura 20 D.

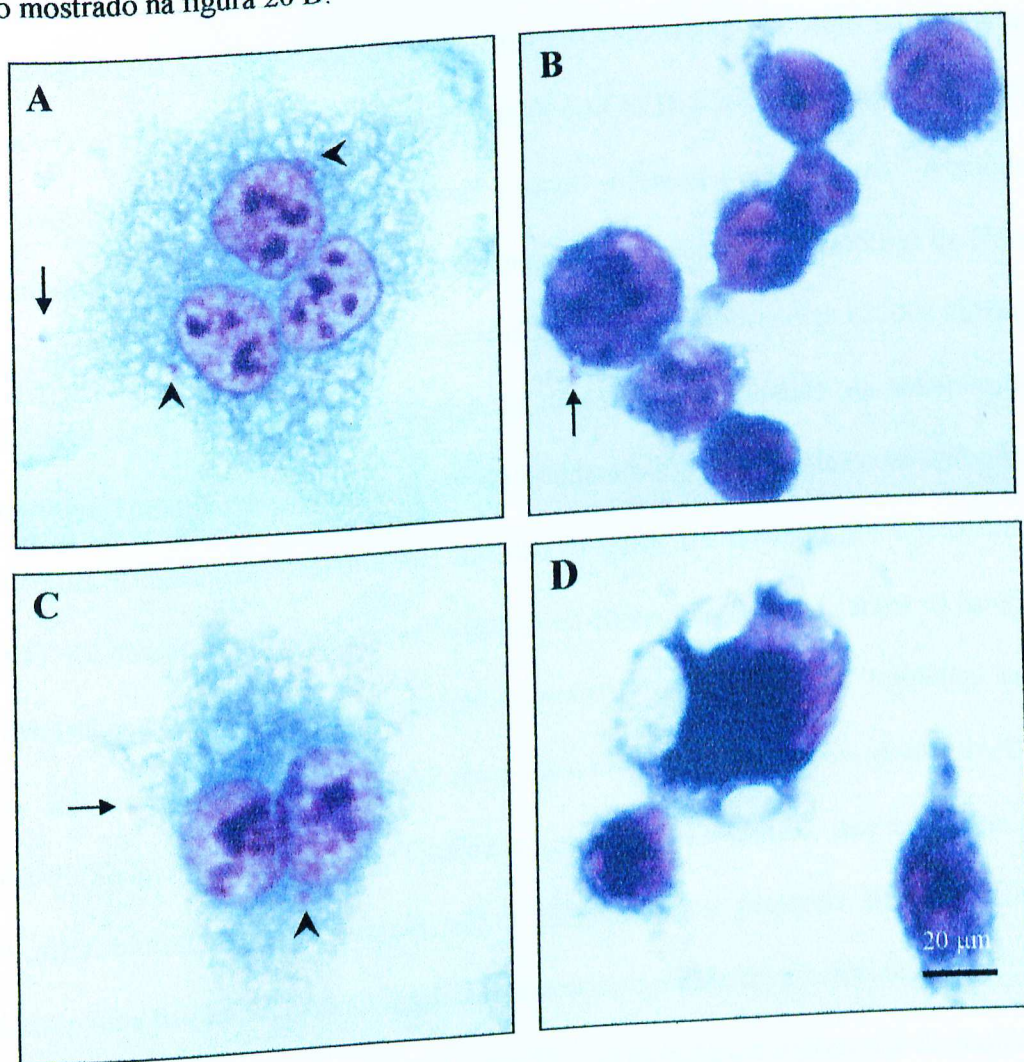


Figura 20. Análise em microscópio de células J774 infectados com taquizoítos de *T. gondii*. Os macrófagos foram estimulados com LPS + IFN- γ (A), F0 (B), F1 (C) e F2 (D) por 24 horas antes da infecção, infectados por 24 horas, fixados e corados com Giemsa. Os taquizoítos aderidos estão apontados por setas pretas e os intracelulares por cabeças de setas.

5. DISCUSSÃO

As frações geradas a partir do fracionamento dos componentes de membrana dos taquizoítos de *T. gondii* mostraram uma atividade estimulatória dos macrófagos. Além disso, a mais hidrofóbica delas foi capaz de inibir invasão de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Este tipo de fracionamento vem sendo realizado há vários anos (TOMAVO *et al.*, 1992; ALMEIDA *et al.*, 2000; GIRALDO *et al.*, 2000) e a partir deste foram isolados glicolipídeos para estudos com diferentes abordagens. Almeida e colaboradores (2000) isolaram glicolipídeos que ancoram mucinas à membrana de *T. cruzi* e avaliaram seu papel na resposta inflamatória. Giraldo e colaboradores (2000) utilizaram glicolipídeos de *T. gondii* como antígeno no diagnóstico sorológico de toxoplasmose, enquanto que Tomavo e colaboradores (1992) estudaram estas moléculas com enfoque em sua estrutura e biosíntese. No presente trabalho, a partir do processo de fracionamento realizado, foi demonstrado que o parasito apresenta componentes importantes na interação com macrófagos. Os resultados encontrados estão de acordo com os trabalhos acima citados. Por exemplo, o perfil eletroforético das moléculas presentes nestas frações é semelhante ao perfil mostrado por Giraldo e colaboradores (2000), que apresenta uma fração mais hidrofóbica (F1'), onde não é evidenciada a presença de componentes protéicos, e uma fração F2' com uma banda larga de baixo peso de glicoproteína.

Os perfis das frações demonstrados em TLC evidenciaram a presença de moléculas ou misturas de moléculas sugestivas de serem glicoconjugados, pois foram coradas pelo orcinol. Entretanto, podem existir outras moléculas que não foram evidenciadas por este sistema, principalmente em F0 (composta de lipídeos neutros, fosfolipídeos e glicolipídeos menos polares), devido a sua composição ou por estarem em concentrações muito inferiores as detectáveis por este método. F1' e F2 apresentaram produtos com Rf de 0,45,

utilizando o mesmo sistema de solventes (clorofórmio:metanol:KCl a 0,2%) empregado por Tomavo e colaboradores (1992). Eles identificaram, através de radiomarcção, quatro precursores de GPI com valores de Rf de 0,45, 0,62, 0,75 e 0,86 para taquizoítos marcados intracelularmente e Rf de 0,42, 0,60, 0,75 e 0,84 para taquizoítos extracelulares. Estes resultados sugerem que F1' e F2' podem conter moléculas precursoras de GPI.

Quanto à atividade biológica, as frações estudadas mostraram uma importante participação na indução de óxido nítrico. Macrófagos J774 foram estimulados de maneira diferente por F1' e F2' para produção de óxido nítrico, dependendo da fonte de taquizoítos utilizados na extração (cultura celular ou lavado peritoneal). Uma possível explicação seria que, dependendo do ambiente, a biosíntese das moléculas utilizadas pelo parasito sofre modificações, produzindo moléculas com diferenças pequenas, e provocando mudanças em suas atividades. Almeida e colaboradores (2000) mostraram que as formas epimastígotas e tripomastígotas de *T. cruzi* apresentam âncoras GPI de mucinas com pequenas diferenças na parte lipídica. Isto é suficiente para tornar GPI de epimastígotas inativas e GPI de tripomastígotas ativas, quanto a capacidade de estimular macrófagos.

F1' e F2' não perderam capacidade estimulatória de células J774 com o aquecimento, como ocorreu com IFN- γ . Isso demonstra que as moléculas ativas, presentes nestas frações, não possuem natureza protéica e tratam-se de moléculas termoestáveis. Uma outra característica de F1' e F2', mostrada em experimento com frações provenientes de taquizoítos de cultura celular, é a capacidade de estimular macrófagos de maneira dose-dependente. Além disso, F2' mostrou uma atividade estimulatória considerável em doses menores que F1', sugerindo que esta fração foi mais ativa que F1', neste caso. Considerando-se que em experimentos onde F1' foi proveniente de taquizoítos de lavado peritoneal, concentrações menores de F1' levaram a uma produção elevada de NO,

reforçando-se a idéia de que a fonte de taquizoítos é um importante fator a ser levado em conta no processo de interação entre macrófago e parasito.

O tratamento com anticorpos anti-TLR2 não levou a alteração significativa da produção de NO estimulada por F0, F1' ou F2', embora possa ser observada uma tendência a uma redução parcial da produção para F1'. É possível que as moléculas presentes nestas frações não ativem os macrófagos através deste receptor, ou que mais de um receptor TLR seja necessário e o bloqueio apenas de TLR-2 não tenha produzido o efeito esperado. Para analisar melhor o envolvimento destas frações com os receptores TLR, seriam necessárias outras abordagens, como o uso de animais "knockout", células transfectadas com TLRs ou o bloqueio com mais de um anticorpo. Além disso, recentemente foi demonstrada a importância de uma molécula acessória (CD36) no reconhecimento de ligantes de TLR-2, como diacilglicerídeos (HOEBE *et al.*, 2005)

Das frações utilizadas nos experimentos anteriores, F1' é a mais hidrofóbica e estimula uma maior produção de NO do que F2' e F3'. Entretanto, utilizando um protocolo diferente, outras frações foram obtidas (F0, F1 e F2), e F0 passou a ser a fração mais hidrofóbica. Além disso, esta fração também contribuiu para uma maior produção de NO em macrófagos J774. Estes resultados sugerem que as moléculas ativadoras de macrófagos são de natureza hidrofóbica. F0, F1 e F2 foram também testadas em macrófagos peritoneais residentes e inflamatórios de camundongos C57BL/6. Somente macrófagos inflamatórios tratados com F0 produziram níveis de NO significativamente maiores que o controle.

Quando foram comparados os dois tipos de macrófagos (M-1 e M-2), notou-se que macrófagos inflamatórios de C57BL/6 tratados com LPS + IFN- γ e frações mantiveram a produção de NO após infecção por *T. gondii*, ao contrário dos macrófagos provenientes de BALB/c. Estes resultados reforçam o conceito M-1/M-2 de Mills e colaboradores (2000),

onde macrófagos provenientes de linhagens de camundongos prototipicamente Th1 (C57BL/6, B10D12) são mais facilmente ativados para produção de NO do que macrófagos de linhagens Th2 (BALB/c, DBA/2).

Para verificar se a ação estimulatória das frações de *T. gondii* pode ser modulada, foi utilizado um extrato de planta, de ação anti-inflamatória conhecida, que foi capaz de inibir a produção de NO por macrófagos J774 estimulados com LPS + IFN- γ . Este extrato não mostrou efeito inibitório na produção de NO por macrófagos tratados com F0. A inibição da produção de NO por extratos de plantas tem sido estudada (RYU *et al.*, 2003a; RYU *et al.*, 2003b) na tentativa de minimizar os efeitos danosos da produção em excesso de NO, que estão relacionados com efeitos graves observados no choque séptico e pode levar à morte (NAPOLITANO *et al.*, 2005). Endotoxinas bacterianas são as principais causas do choque séptico. Por isso, vários extratos foram testados em macrófagos estimulados com LPS + IFN- γ . Dois extratos levaram a porcentagens de inibição da produção de NO superiores a 90% e apresentaram baixa toxicidade para as células: os extratos etanólicos de casca do caule de *Serjania lethalis* e de folhas de *Cupania vernalis*. A produção elevada de NO pela infecção com *T. gondii* também pode levar a danos teciduais e à morte. Camundongos susceptíveis à infecção por *T. gondii* (C57BL/6) sucumbem devido a uma necrose intestinal severa, causada por um processo inflamatório intenso, mediado pela produção local de IFN- γ , TNF- α e NO (LIESENFELD *et al.*, 1996; VOSENKAMPER *et al.*, 2004). Nos resultados apresentados, o extrato etanólico de casca do caule de *Serjania lethalis* não alterou o efeito de F0 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos J774, nem em macrófagos peritoneais murinos infectados. Este extrato também não alterou a produção de NO por macrófagos peritoneais estimulados com F1, mas reduziu significativamente a produção de NO por estas células quando tratadas com F2.

A análise morfológica das células tratadas em diferentes condições evidenciou poucas diferenças entre os grupos de tratamento e entre as células. Em relação ao espraçamento, nota-se que os macrófagos inflamatórios de camundongos C57BL/6 e BALB/c apresentaram uma porcentagem maior de células espraçadas que as células J774. Isto se deve à pré-ativação com tioglicolato, que é capaz de alterar a morfologia celular. Macrófagos J774, quando tratados com F0 apresentaram grandes vacúolos intracelulares, talvez devido à alta capacidade fagocítica destas células. Os três tipos celulares apresentaram números médios de taquizoítos por célula e taquizoítos por vacúolo semelhantes, variando apenas o número de células infectadas. A maioria das células apresentou taquizoítos isolados, mesmo com mais de um taquizoíto por células e em várias células foram observados vacúolos parasitóforos de contornos bem definidos, com dois, quatro ou oito taquizoítos. Estas observações sugerem que F0 interferiu no número de células infectadas, mas não na replicação do parasito.

Quanto à interação de macrófagos com *T. gondii*, os resultados mostraram que macrófagos provenientes de camundongos BALB/c (M-2) foram mais infectados que macrófagos de camundongos C57BL/6 (M-1). Isto se deve, muito provavelmente, às características inerentes destes tipos de macrófagos. Ou seja, macrófagos M-1 são mais facilmente ativados para produção de NO e menos permissíveis à infecção do que M-2. O mesmo se aplica aos macrófagos J774, que mesmo sendo derivados de camundongos BALB/c, mostram porcentagens de infecção baixas. Esta linhagem de macrófagos possui características particulares, como a alta capacidade fagocítica e a síntese de grandes quantidades de lisozima e IL-1 β (RALPH & NAKOINZ, 1975; VAN FURTH *et al.*, 1985), que podem contribuir para sua resistência à infecção.

Foi também observado que a fração F0 de *T. gondii* foi capaz de reduzir a adesão e a invasão de macrófagos inflamatórios de peritônio de camundongos BALB/c, mas não de

macrófagos provenientes de C57BL/6 ou de macrófagos J774. Entretanto, parece que este fenômeno não está relacionado com o efeito de NO sobre o parasito, pois a produção de NO por macrófagos de BALB/c tratados com F0, após a infecção, foi baixa. O fato de F0 ter reduzido a adesão do parasito nestas células sugere que esta fração contenha moléculas que promoveram um bloqueio de receptores na membrana das células, impedindo a ligação do parasito. O bloqueio da interação entre *T. gondii* e células hospedeiras foi demonstrado por CARRUTHERS *et al.* (2000). Eles mostraram que *T. gondii* reconhece glicosaminoglicanas (GAGs) da membrana celular das células hospedeiras e que o tratamento com excesso de GAGs bloqueou a adesão do parasito às células hospedeiras.

O tratamento dos macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c com extrato de *S. lethalis* foi capaz de reduzir a infecção nos grupos controle e tratados com LPS + IFN- γ e com frações. A capacidade de *S. lethalis* de inibir a invasão de macrófagos por *T. gondii* em conjunto com seu efeito inibitório sobre a produção de NO, apesar de ser um mecanismo independente daquele promovido pelas frações de *T. gondii*, torna esta planta um bom candidato para estudo de mecanismos de interação parasito-célula hospedeira.

CONCLUSÕES

- O processo de fracionamento de componentes de membrana de *T. gondii* com diferentes graus de hidrofobicidade permitiu a obtenção de frações ricas em moléculas capazes de interferir na produção de NO por macrófagos murinos.
- As frações mais hidrofóbicas apresentaram maior capacidade de estimular macrófagos J774 para produção de NO.
- A atividade das frações é dose-dependente, não é perdida com o aquecimento e não é inibida por anticorpos anti-TLR2.
- O tratamento *in vitro* de macrófagos com as frações do parasito não alterou a morfologia celular, nem a viabilidade celular.
- Macrófagos inflamatórios provenientes de camundongos BALB/c apresentaram maiores porcentagens de infecção do que macrófagos de C57BL/6 e células J774 e não mantiveram a produção de NO após infecção por *T. gondii*.
- A fração F0 inibiu a adesão e a invasão de taquizoítos de *T. gondii* em macrófagos inflamatórios de BALB/c, embora estas células tratadas com F0 não foram capazes de manter a produção de NO.
- O extrato etanólico de *S. lethalis* inibiu a produção de NO por macrófagos J774 e macrófagos peritoneais murinos ativados com LPS+IFN- γ por um mecanismo independente daquele que é responsável pela estimulação de óxido nítrico provocada pelo tratamento com as frações mais hidrofóbicas de *T. gondii*.
- O extrato etanólico de *S. lethalis* diminuiu a invasão de macrófagos de C57BL/6 e BALB/c por taquizoítos de *T. gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. C.; CAMARGO M. M.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. & FERGUSON, M. A. J. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 7, p. 1476-1485, 2000.
- BALDASSARRI, L.; BERTUCCINI, L.; CRETÍ, R.; FILIPPINI, P.; AMMENDOLIA, M. G.; KOCH, S.; HUEBNER, J. & OREFICI G. Glycosaminoglycans Mediate Invasion and Survival of *Enterococcus faecalis* into Macrophages. **The Journal of Infectious Disease**, v. 191, n. 8, p. 1253-1262, 2005.
- BASTOS, K. R. B.; MARINHO, C. R. F.; RUSSO, M.; ÁLVAREZ, J. M. & LIMA, M. R. D. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 6, p. 630-636, 2004.
- BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R-B.; BELISLE, J. T.; BLEHARSKI, J. R.; MAITLAND, M.; NORGARD, M. V.; PLEVY, S. E.; SMALE, S. T.; BRENNAN, P. J.; BLOOM, B. R.; GODOWSKI, P. J. & MODLIN, R. J. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. **Science**, v. 285, p. 732-736, 1999.
- CARRUTHERS, V. B.; HÅKANSSON, S.; GIDDINGS, O. K. & SIBLEY, D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4005-4011, 2000.

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

CHI, D. S.; QUI, M.; KRISHNASWAMY, G.; LI, C.; STONE, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 127-132, 2003.

- COSTA, I. R.; ARAÚJO, F. S. & LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, n. 4, p. 759-770, 2004.

- DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; DUBREMETZ, J. F.; GEYER, H.; GEYER, R.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R. & SCHWARZ, R. T. Roles of Glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*: induction of tumor necrosis factor- α production in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32987-32993, 2003.

- DELPUTTE, P. L.; COSTERS, S. & NAUWYNCK, H. J. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. **The Journal of General Virology**, v. 86, p. 1441-1445, 2005.

- DENKERS, E. Y. & GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

- DENKERS, E. Y.; KIM, L. & BUTCHER, B. A. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. **Cellular microbiology**, v.5, n. 2, p. 75-83, 2003.

- DERRICO, C. A. & GOODRUM, K. J. Interleukin-21 and tumor necrosis factor alpha innate production of gamma interferon by group B streptococcus-treated splenocytes of severe combined immunodeficiency mice. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1314-1320, 1996.

- DOBROWOLSKI, J. M.; CARRUTHERS, V. B. & SIBLEY, L. D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 163-173, 1997.

- DOBROWOLSKI, J. M. & SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 933-939, 1996.

- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. & SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998

- FEARON, D. T. & LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v.272, p. 50-53, 1996.

- FERREIRA, A. P.; SOARES, G. L.; SALGADO, C. A.; GONÇALVES, L. S.; TEIXEIRA, F. .M.; TEIXEIRA, H. C. & KAPLAN, M. A. Immunomodulatory activity of *Mollugo verticillata* L. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 154-158, 2003.

- FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, P. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W. A. & GAZZINELLI, R. T. The role of cytokines and major histocompatibility complex restriction mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6392-6401, 2003.

- GIRALDO, M.; CANNIZZARO, H; FERGUSON, M.A.; ALMEIDA, I.C. & GAZZINELLI, R.T. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p.1453-1460, 2000.

- GORDON, S. The macrophage. **BioEssays**, v. 17, n. 11, p. 977-986, 1995.

- GRATCHEV, A.; KZHYSHKOWSKA, J.; UTIKAL, J. & GOERDT, S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 61, n. 1, p. 10-17, 2005.

- GRIMWOOD, J. & SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **International Journal of Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 169-173, 1996.
- GUDERSEN, G. G. & COOK TA. Microtubules and signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 81-84, 1999.
- HOEBE, K.; GEORGEL, P.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; MUDD, S.; CROZAT, K.; SOVATH, S.; SHAMEL, L.; HARTUNG, T.; ZAHNINGER, U & BEUTLER, B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. **Nature**, v. 433, p. 523-527, 2005.
- HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A. & EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313-1318, 1999.
- JOINER, K. A.; FUHRMAN, S. A.; MIETTINEN, H. M.; KASPER, L. H. & MELLMAN, I. *Toxoplasma gondii* fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. **Science**, v. 249, p. 641-646, 1990.
- KAHN, S.; WLEKLINSKI, M.; ARUFFO, A.; FARR, A.; CODER, D. & KAHN, M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophage is facilitated by the mannose receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1243-1258, 1995.
- KASPER, L. H. & MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184-188, 1994.

- KUMAMOTO, Y.; HIGASHI, N.; DENDA-NAGAI, K.; TSUIJI, M.; SATO, K.; CROCKER, P. R. & IRIMURA, T. Identification of sialoadhesin as a dominant lymph node counter-receptor for mouse macrophage galactose-type C-type lectin 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 49274-49280, 2004.

- LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S. & SUZUKI, Y. Association of CD4⁺ T cell-dependent, interferon- γ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 597-607, 1996.

- LÜDER, C. G. K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N. & Groß, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 833-844, 2003.

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

- MCGILVRAY, I. D.; SERGHIDES, L.; KAPUS, A.; ROTSTEIN, O. D. & KAIN, K. C. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*- parasited erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3231- 3240, 2000.

- MILLER, M. A., SKEEN, M. J. & ZIEGLER, H. K. A synthetic peptide administered with IL-12 elicits immunity to *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 8, p. 3675-3679, 1997.

- MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J. & HILL, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

- MINEO, J. R.; MCLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I. A.; ELY, K. H. & KASPER, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3951-3964, 1993.

- MORDUE, D. G.; DESAI, N.; DUSTIN, M. & SIBLEY, D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 12, p. 1783-1792, 1999.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

- MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; PIAO, L. X.; TAKEUCHI, O., AKIRA, S.; ISHIKURA, H. & YANO, A. TLR2 as an essential molecule for protective

immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **International Immunology**, v. 19, n. 5, p. 1081-1087, 2003.

- MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R.; VEER, C. V.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L. P.; ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5998-6004, 2000.

- NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SOUZA, M. A.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. & ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

- O'NEILL, L. Specificity in the innate response: pathogen recognition by Toll-like receptor combinations. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 70, 2001.

- ORTEGA-BARRIA, E. & BOOTHROYD, J. C. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 3, p. 1267-1276, 1999.

- RAHMAH, N.; ANUAR, A. K. Demonstration of antigenic similarities and variations in excretory/secretory antigens of *Toxoplasma gondii*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 187, p. 294-298, 1992.

- RALPH, P. & NAKOINZ, I. Phagocytosis and histolysis by a macrophage tumor and its cloned cell line. **Nature**, v. 257, p. 393-394, 1975.

- REIS, D. S.; SOUZA, M. A.; MINEO, J. R.; ESPINDOLA, F. S. Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 34, n. 2, p. 221-226, 2001.

- RYU, J. H.; AHN, H.; KIM, J. Y. & KIM, Y. K. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 485-489, 2003a.

- RYU, J. H.; AHN, H. & JIN LEE, H. Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 350-354, 2003b.

- SATOSHI, U. & SHIZUO A. TLR family and viral infection. **Uirusu**, v. 54, n. 2, p. 145-151, 2004.

- SHIBATA, Y., METZGER, W. J. & MYRVIK, Q. N. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. **The Journal of Immunology**, v. 159, p. 2462-2467, 1997.

- SKENN, M. J., MILLER, M. A., SHINNICK, T. M. & ZIEGLER, H. K. Regulation of murine macrophage IL-12 production: activation of macrophages in vivo, restimulation in

vitro, and modulation by other cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 1196-1206, 1996.

- SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L. E.; LIESENFELD, O.; FORT, M.; KANG, H. & GUFWOLI, E. IL-10 Is Required for Prevention of Necrosis in the Small Intestine and Mortality in Both Genetically Resistant BALB/c and Susceptible C57BL/6 Mice Following Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 5375-5382, 2000.

- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 4, p. 625-635, 2001.

- TEIXEIRA, J. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. & VALLE, J. R. Timbos: ichthyotoxic plants used by Brazilian Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 311-318, 1984.

- THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M. T.; ENGELE, M.; SIELING, P. A.; BARNERS, P. F.; RÖLLINGHOFF, M.; BÖLCSKEI, P. L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGARD, M. V.; BELISLE, J. T.; GODOWSKI, P. J.; BLOOM, B. R. & MODLIN, R. L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. **Science**, v. 291, p. 1544-1547, 2001.

- TOMAVO, S.; DUBREMETZY, J. F. & SCHWARZ, R. T. A Family of Glycolipids from *Toxoplasma gondii*: Identification of candidate glycolipid precursor(s) for

Toxoplasma gondii glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 17, p. 11721-11726, 1992.

- VAN FURTH, R.; VAN SCHADEWIJK-NIEUWSTAD, M.; ELZENGA-CLAASEN, I.; CORNELISSE, C. & NIBBERING, P. Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines. *Cellular Immunology*, v. 90, n. 2, p. 339-357, 1985.

- VOSSenkAMPER, A.; STRUCK, D.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; WENT, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; PFEFFER, K.; ALBER, G.; LOCHNER, M.; FORSTER, I. & LIESENFELD, O. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *European Journal of Immunology*, v. 34, n. 11, p. 3197-207, 2004.

- YOSHIDA, A., KOIDE, Y., UCHIJIMA, M. & YOSHIDA, T. O. IFN- γ induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 198, n. 3, p. 857-861, 1994.

- ZAMORA, R.; BULT, H. & HERMAN, A. G. The role of prostaglandin E₂ and nitric oxide in cell death in J774 murine macrophages. *European Journal of Pharmacology*, v. 349, n. 2-3, p. 307-315, 1998.