

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**SISBI/UFU**



1000211164

MON  
616.24-002-053.2  
B715 P  
TES/MEH

**Participação de proteínas ligantes de heparina na interação entre**  
***Toxoplasma gondii* e as células hospedeiras**

**Martha Ribeiro Bonilha**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena**

**Uberlândia – MG**  
**2003**

**Martha Ribeiro Bonilha**

**Participação de proteínas ligantes de heparina na interação entre  
*Toxoplasma gondii* e as células hospedeiras**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte dos requisitos *para* obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena

**Uberlândia – MG  
2003**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, que me apoiou em todos os momentos.

Aos amigos, que de forma carinhosa, compreenderam minha falta de tempo, em vários momentos, e sempre me incentivaram a seguir em frente.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Janethe D. O. Pena, pelo acolhimento e orientação desse trabalho e pela visão sempre otimista.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pelo incentivo e pelas valiosas sugestões.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Aparecida de Souza, pelas inestimáveis contribuições durante todo trabalho.

À Deise Aparecida Oliveira Silva e ao Jair Pereira da Cunha Júnior, pela boa vontade em compartilhar seus conhecimentos e em trocar idéias.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso, pelo contagiante bom humor e sugestões.

Às alunas da graduação, Amanda e Carla, com quem compartilhei grande parte dos experimentos, e cuja colaboração foi muito importante.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelos momentos de convivência e por tudo que aprendi com cada um deles e, especialmente, aos amigos Cristina, Sandra e Adriano, pelo companheirismo que suavizou esta jornada.

Aos funcionários, Andréa e Antônio Tomás, pelo auxílio tantas vezes dispensado.

Ao João Martins Neto, pela atenção e boa vontade com que sempre nos recebeu.

Ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo seqüenciamento N-terminal das proteínas.

Agradeço e dedico este trabalho a DEUS e aos MESTRES que sempre iluminaram o meu caminho.

## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>vi</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>viii</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
1.1.1 Aspectos gerais .....	2
1.1.2 Morfologia .....	3
1.1.3 Ciclo biológico .....	4
1.1.4 Transmissão e aspectos clínicos .....	7
1.1.5 Imunologia .....	9
1.2 Adesão e invasão de células hospedeiras por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
<b>2 Objetivo .....</b>	<b>17</b>
<b>3 Material e métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1 Obtenção de taquizoítas <i>in vitro</i> .....	20
3.2 Obtenção de taquizoítas <i>in vivo</i> .....	21
3.3 Preparação de antígenos .....	21
3.4 Isolamento de proteínas ligantes de heparina .....	22
3.5 Biotinilação de heparina-albumina e de albumina .....	22
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferência .....	23
3.7 Western-blotting .....	23
3.8 Seqüenciamento N-terminal .....	24
<b>4 Resultados .....</b>	<b>25</b>
4.1 Isolamento de proteínas ligantes de heparina .....	26
4.2 Identificação de uma proteína de camundongo associada aos taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	30
<b>5- Discussão .....</b>	<b>32</b>
<b>6- Conclusões .....</b>	<b>39</b>
<b>7- Referências bibliográficas .....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	- Célula apresentadora de antígeno
BSA	- Soro albumina bovina
CMI	- Complexo da membrana interna
GAG	- Glicosaminoglicana
HFF	- <i>Human foreskin fibroblast</i>
IFN- $\gamma$	- Interferon $\gamma$
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
NO	- Óxido nítrico
PBS	- Salina tamponada com fosfatos
PVDF	- Polivinilidene-difluoreto
SAG	- Antígenos de superfície
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SNC	- Sistema nervoso central
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral $\alpha$
TSP	- Trombospondina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de um taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> e do complexo apical .....	3
Figura 2.	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	5
Figura 3.	Cromatografia de afinidade em coluna de heparina imobilizada em gel agarose, utilizando-se gradiente descontínuo de NaCl e análise eletroforética .....	27
Figura 4.	Análise de proteínas solúveis de <i>T. gondii</i> submetidas a cromatografia e a eletroforese em diferentes condições. Fração ligante de heparina eluída, submetida a eletroforese e transferida para membrana de nitrocelulose, seguida de incubação com heparina biotinizada e revelação por ECL .....	29
Figura 5.	Calgranulina A em lisados de <i>T. gondii</i> colhidos de camundongo Swiss ou cultivados em HFF aplicados em coluna de afinidade de heparina e eluídos .....	31
Figura 6.	Controle com células de lavado peritoneal de camundongo .....	31

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é capaz de infectar praticamente todos os tipos de células nucleadas. Isto sugere que o parasito pode ligar-se a receptores ubiqüitariamente distribuídos. O objetivo deste estudo foi identificar proteínas ligantes de heparina envolvidas na adesão de *T. gondii* às células hospedeiras, uma vez que, moléculas heparina/heparan sulfato, integrantes da matriz extracelular, são possíveis receptores para o parasito. Taquizoítas da cepa RH, obtidos de exsudato peritoneal de camundongos infectados ou de células HFF, foram lisados com Triton X-100 a 1%, a 37°C, e a fração solúvel resultante foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna de heparina. Os ligantes de heparina foram eluídos com NaCl e analisados por SDS-PAGE, revelando proteínas com pesos moleculares entre 5kDa e 100kDa. Um polipeptídeo de aproximadamente 5kDa sofreu seqüenciamento N-terminal, revelando 100% de homologia com calgranulina A de camundongo, uma proteína ligante de cálcio. Esta proteína não foi dissociada quando os parasitos foram lavados com NaCl a 1,0M antes da lise, sugerindo estabilidade na ligação à superfície do parasito. Nossos resultados indicam que taquizoítas de *T. gondii* podem adsorver proteínas ligantes de heparina do hospedeiro, tais como calgranulina A, que potencialmente poderiam participar dos eventos de adesão e invasão parasitária.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, heparina, adesão, invasão, calgranulina A.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is able to invade virtually any nucleated cell, suggesting that this parasite may bind through a ubiquitous receptor. The aim of this study was to identify heparin-binding proteins involved in *T. gondii* adhesion to host cells, since heparin/heparan sulfate proteoglycans are putative receptors for the parasite. Tachyzoites from RH strain collected from mouse peritoneal exudate or HFF cells were extracted with 1% Triton-X-100 at 37°C and the soluble fraction was applied onto a heparin affinity column. Heparin ligands were eluted with NaCl and resolved by SDS-PAGE. Proteins ranging in weight from 5-100kDa were identified and blotted onto a PVDF membrane. A polypeptide of approximately 5kDa was N-terminal sequenced, revealing 100% homology with mouse calgranulin A, a calcium-binding protein. This protein was not dislocated when parasites were washed with 1M NaCl before lysis, indicating a stable binding to the parasite surface. Our results demonstrated that *T. gondii* tachyzoites might adsorb host heparin-binding proteins, suggesting that the parasite may utilize such proteins, like calgranulin A, to facilitate adhesion and invasion of the host cells.

**Key-words:** *Toxoplasma gondii*, heparin, adhesion, invasion, calgranulin A.



## ***1- INTRODUÇÃO***

## 1.1 *Toxoplasma gondii*

### 1.1.1 Aspectos gerais

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um parasito intracelular obrigatório, descoberto no Brasil, por Splendore (1908), em coelhos de laboratório e, na Tunísia, por Nicolle e Manceaux (1909), no roedor *Ctenodactylus gondi*.

O parasito pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma* (REY, 1991). O nome do gênero é derivado das palavras gregas “toxon” (arco) e “plasma” (forma), em referência à forma de arco ou crescente em que o parasito é mais comumente observado, e o nome da espécie vem do roedor no qual ele foi encontrado.

*T. gondii* tem ampla distribuição geográfica e é um dos parasitos mais comuns do homem e de outros vertebrados, inclusive aves. Estima-se que a taxa de infecção humana varia entre 15% e 85%, dependendo do país (CLEARY *et al.*, 2002). A primeira descrição da infecção na espécie humana foi feita em 1923, na então Tchecoslováquia, quando Janku documentou a presença de parasitos em cortes do globo ocular de uma criança, falecida aos 11 meses, que apresentava hidrocefalia e cegueira (AMATO NETO *et al.*, 1982).

A toxoplasmose, infecção causada por *Toxoplasma gondii*, geralmente é assintomática e evolui para a fase crônica sem complicações significativas. A grande importância desta parasitose deve-se à possibilidade de causar defeitos congênitos e abortos, e por ser uma das causas mais freqüentes de infecção oportunista em indivíduos imunodeprimidos (LUFT e REMINGTON, 1992; FERREIRA e BORGES, 2002).

### 1.1.2 Morfologia

Assim como outros membros do filo Apicomplexa, *T. gondii* se caracteriza por possuir uma região apical especializada, rica em organelas associadas ao processo de invasão da célula hospedeira (MORRISSETTE *et al.*, 1994). As formas taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta são haplóides, infectantes e morfologicamente semelhantes (BOOTHROYD *et al.*, 1998; DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998).

Os taquizoítas geralmente apresentam a forma crescente, com aproximadamente 2µm x 6µm, tendo a extremidade anterior afilada e a posterior arredondada (Figura 1). Ultraestruturalmente observa-se uma película, anéis apicais (ou preconoidais), anéis polares, conóide, roptrias, micronemas, microporos, mitocôndria, microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos, núcleo, grânulos densos, apicoplasto, poro posterior e grânulos de amilopectina, que podem estar ou não presentes (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998).

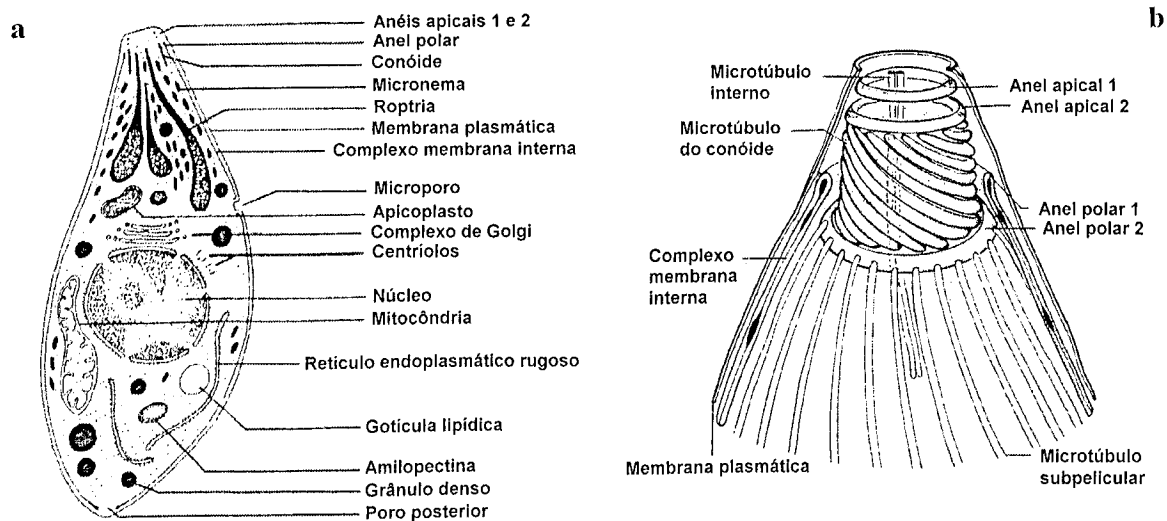


Figura 1. Representação esquemática de um taquizoíta de *Toxoplasma gondii* (a) e do complexo apical (b). (Fonte: DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998)

A película é composta pela membrana plasmática e pelo complexo da membrana interna (CMI) formado por duas membranas muito próximas, que são descontínuas acima dos anéis polares e nas regiões do microporo e do poro posterior (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998). Dois anéis preconoidais estão localizados na extremidade anterior da célula e circundam o topo do conóide; estrutura semelhante a um tubo, constituído de 14 subunidades em diagonal (NICHOLS e CHIAPPINO, 1987). O anel polar anterior é um espessamento do CMI que cerca o conóide (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998). Abaixo do conóide, o anel polar posterior atua como um centro organizador de microtúbulos, ancorando 22 microtúbulos subpeliculares, que percorrem, em espiral, aproximadamente dois terços do corpo do parasito, alinhados na mesma orientação das subunidades do conóide (sentido anti-horário). Dois microtúbulos internos, estreitamente associados partem do anel preconoidal anterior e atravessam o interior do conóide, terminando um pouco abaixo do mesmo (NICHOLS e CHIAPPINO, 1987).

Micronemas, roptrias e grânulos densos são organelas secretoras. Micronemas têm estrutura semelhante a hastes e se localizam principalmente na parte anterior do parasito. As roptrias, 8 a 10 organelas em forma de clava, estão entre a extremidade anterior e o núcleo, e mostram um estreitamento na parte que fica no interior do conóide. Já os grânulos densos, estruturas esféricas, apresentam-se mais dispersos pelo corpo do taquizoíta (DUBEY, LINDSAY e SPEER, 1998).

### 1.1.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *T. gondii* inclui duas fases, uma assexuada, que ocorre tanto no hospedeiro definitivo quanto no intermediário, e outra sexuada, que acontece somente no intestino dos hospedeiros definitivos (FRENKEL, DUBEY e MILLER, 1970). Os hospedeiros definitivos do parasito são o gato e outros felídeos, enquanto os hospedeiros

intermediários incluem o homem e outros mamíferos, além de diferentes espécies de aves. O parasito possui um ciclo vital complexo, com três formas principais: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (Figura 2).

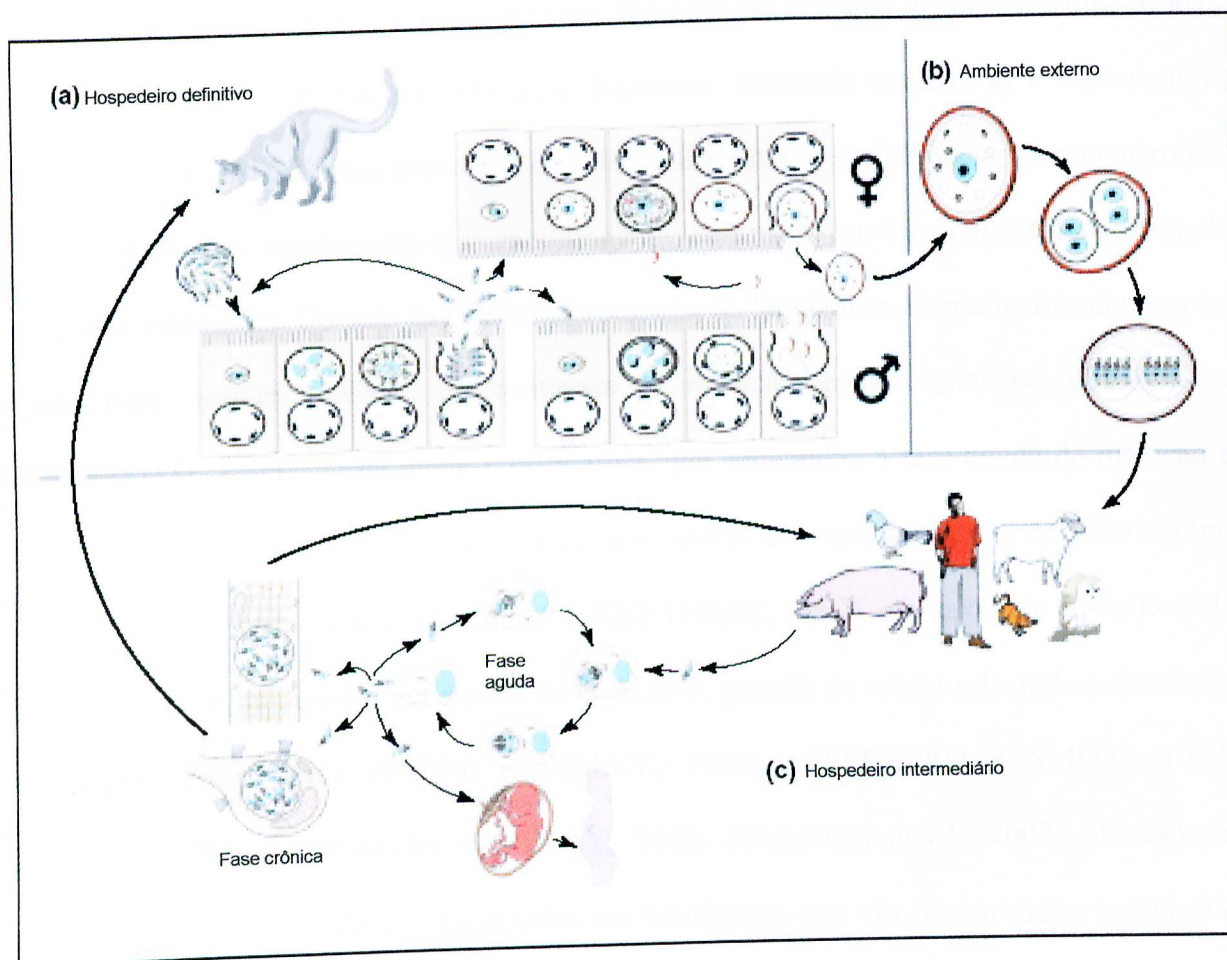


Figura 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (Fonte: Ferguson, 2002)

Os taquizoítas e bradizoítas são encontrados nas células de diferentes tecidos dos hospedeiros intermediários e definitivos. Os esporozoítas são encontrados dentro de oocistos maduros, no meio ambiente, após terem sido eliminados, na forma imatura, juntamente com as fezes de hospedeiros definitivos (FRENKEL, DUBEY e MILLER, 1970).

A forma taquizoíta, cuja denominação vem da palavra grega “tachos” (rápido), replica rapidamente e está relacionada principalmente com a disseminação da infecção para

diferentes tecidos do mesmo hospedeiro. A forma cística, bradizoíta, de replicação lenta (“brady” = lento), está mais relacionada com a propagação da infecção entre diferentes hospedeiros e com episódios de agudização da toxoplasmose em indivíduos cronicamente infectados e imunodeprimidos (BERTOLI *et al.*, 1995; DUBEY, 1998a; SUZUKI, 2002).

A fase assexuada ocorre quando cistos teciduais ou oocistos maduros são ingeridos e se rompem durante a passagem pelo trato digestivo, liberando bradizoítas e esporozoítas, respectivamente. Estas formas penetram no epitélio intestinal e se diferenciam em taquizoítas, que se multiplicam rapidamente por endodiogenia, dentro do vacúolo parasitóforo formado nas células infectadas. Quando as células se rompem, os taquizoítas liberados invadem novas células com grande rapidez, disseminando a infecção pelo organismo (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Nesta etapa proliferativa, que caracteriza a fase aguda da infecção e ocorre nos primeiros 8 a 12 dias, os taquizoítas podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) e também atravessar a placenta (CARRUTHERS, 2002). As taxas de invasão e de multiplicação dos taquizoítas dependem da cepa de *T. gondii*, da célula infectada e do estado imunológico do paciente (HOWE e SIBLEY, 1995; APPLEFORD e SMITH, 1997; JOHNSON, 1997; BARRAGAN e SIBLEY, 2002; JOHNSON *et al.*, 2002). A resposta imune induz a diferenciação dos taquizoítas em bradizoítas que vão formar cistos teciduais e marca o início da fase crônica da infecção. Estes cistos se localizam predominantemente no SNC e no tecido muscular, onde podem permanecer por toda a vida do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002).

Quando são ingeridas formas taquizoítas, as que penetram pela mucosa oral podem ter a mesma evolução dos bradizoítas e esporozoítas (DUBEY, 1998b; TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000). *T. gondii* é capaz de se reproduzir e disseminar indefinidamente na natureza, através do ciclo assexuado, circulando pela cadeia alimentar (BOOTHROYD e GRIGG, 2002).

O ciclo sexuado tem início quando um felídeo suscetível ingere cistos teciduais contendo bradizoítas, oocistos maduros do solo ou taquizoítas. Depois que uma dessas formas infectantes, penetra no epitélio intestinal e ocorre multiplicação por merogonia. Formam-se merozoítas que, ao romperem a célula, penetram em novas células, onde se transformam em microgametas flagelados ou macrogametas. Os microgametas saem e se fundem com macrogametas produzindo zigotos. Estes evoluem para oocistos com a formação de uma parede dupla e, após o rompimento da célula, são eliminados ainda imaturos juntamente com as fezes. Aproximadamente quatro dias depois de estarem no ambiente externo ocorre a esporulação e o oocisto passa a apresentar dois esporocistos com quatro esporozoítas cada. Estas formas são altamente infectantes e podem permanecer viáveis por um ano ou mais no meio ambiente (NEVES *et al.*, 2000).

#### **1.1.4 Transmissão e aspectos clínicos**

A infecção pelo *Toxoplasma gondii* pode ser congênita ou adquirida. Na maioria das vezes é assintomática e não deixa seqüelas. A toxoplasmose congênita ocorre quando a mulher adquire a infecção durante a gravidez. Quanto mais precocemente a gestante for infectada, mais graves as seqüelas, quando ocorre transmissão congênita. À medida que a gestação transcorre, apesar de aumentar a probabilidade de passagem transplacentária, a gravidade das seqüelas diminui. Mesmo que a mãe não tenha sintomas clínicos, pode haver uma parasitemia e lesões focais na placenta, que podem levar à infecção do feto. Quando não é fatal, o quadro clínico pode apresentar desde uma ligeira diminuição da visão até a completa téttrade de sinais: retinocoroidite, hidrocefalia, perturbações neurológicas e calcificação intracerebral. A seqüela mais comum da toxoplasmose congênita é a doença ocular (DESMONTS e COUVREUR, 1974). A infecção também pode ficar latente por anos e emergir na segunda ou terceira década de vida do indivíduo, causando severa retinocoroidite.

Esta manifestação pode ocorrer igualmente como consequência de infecção aguda pós-natal (HOLLAND, 1999; ROBERTS e McLEOD, 1999; GILBERT e STANFORD, 2000).

A infecção adquirida após o nascimento geralmente é devida à ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida ou pela ingestão acidental de alimentos e água contaminados com oocistos de fezes de felinos infectados. A ingestão de leite não pasteurizado e a negligência com os cuidados de higiene podem influenciar a aquisição de toxoplasmose (JOHNSON, 1997; COOK *et al.*, 2000; TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000). A toxoplasmose também pode ser transmitida através de transfusão de sangue e de transplante de órgãos (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; HILL e DUBEY, 2002). As manifestações clínicas mais comuns são: linfadenopatia, febre, cefaléia, além de mialgia, rigidez de nuca, exantema cutâneo, dor de ouvido, anorexia, dor de garganta, artralgia, confusão mental, náusea, dor nos olhos e dor abdominal (HILL e DUBEY, 2002).

Após a infecção provocada por qualquer uma das formas infectantes, taquizoítas multiplicam-se em uma variedade de células, diferenciam-se em bradizoítas e formam cistos teciduais em vários órgãos, especialmente no cérebro, no coração e no músculo esquelético, iniciando a fase crônica da infecção, o período latente (SUZUKI, 2002). A diferenciação de taquizoítas em bradizoítas está relacionada com o início da imunidade protetora. Os bradizoítas permanecem na célula, dentro do vacúolo parasitóforo que se converte em um cisto, protegidos do sistema imune. Estes cistos teciduais podem persistir por toda a vida do hospedeiro, sem causar nenhum transtorno (GROSS *et al.*, 1996). Acredita-se que, ocasionalmente, estes cistos se rompem e os bradizoítas liberados são rapidamente eliminados pelo sistema imune de hospedeiros imunocompetentes (LUFT e REMINGTON, 1992; BERTOLI *et al.*, 1995).

Em indivíduos imunodeprimidos, especialmente naqueles com imunidade celular deficiente, os bradizoítas liberados de cistos teciduais diferenciam-se em taquizoítas,



multiplicam-se no local, disseminam-se pelo organismo e reativam a infecção. A encefalite toxoplásmica é a manifestação mais importante desta reativação, devido aos graves danos que podem ser fatais (LUFT e REMINGTON, 1992; BERTOLI *et al.*, 1995; SUZUKI, 2002). Considerando-se que indivíduos imunocompetentes não apresentam nenhum sinal aparente de reativação da infecção, é evidente que a resposta imune é crítica para preveni-la (SUZUKI, 2002).

Apesar de ser uma infecção geralmente assintomática, mantida sob controle pelo sistema imune, as seqüelas devido à toxoplasmose têm grande impacto sócio-econômico, especialmente no que se refere às crianças que apresentam retardo mental e alterações visuais (ROBERTS, MURRELL e MARKS, 1994).

### 1.1.5 Imunologia

A infecção por *Toxoplasma* estimula tanto resposta imune humoral como celular, sendo esta última mais importante no desenvolvimento de uma imunidade protetora e persistente (GROSS *et al.*, 1996). São produzidas as imunoglobulinas (Ig) IgM, IgA, IgE e IgG. As IgA e IgM são importantes para o diagnóstico de toxoplasmose aguda e/ou congênita, pois seus títulos declinam gradualmente, desaparecendo em alguns meses. Entretanto, títulos baixos de IgM podem persistir durante mais de um ano. Títulos altos de IgG são detectados por um longo tempo antes de diminuírem progressivamente, e títulos baixos geralmente persistem por toda a vida do indivíduo (REY, 1991).

Os neutrófilos, que migram rapidamente durante o início da infecção e os macrófagos ativados, secretam produtos tóxicos como óxido nítrico (NO) e metabólitos reativos de oxigênio, moléculas envolvidas na morte intracelular de *Toxoplasma gondii* (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1997). Os neutrófilos produzem tanto interleucina-12 (IL-12) como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), ao serem estimulados por *T. gondii* (SCHARTON-KERSTEN

*et al.*, 1996; BLISS, ZHANG e DENKERS, 1999). A produção de IL-12 no início da infecção é essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora Th1. Macrófagos ativados e células dendríticas também secretam esta citocina em resposta ao parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1993a; REIS E SOUSA *et al.*, 1997; FISCHER, BONIFAS e REICHMANN, 2000). IL-12, juntamente com TNF- $\alpha$ , induzem as células NK (*natural killer*) a produzirem interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), uma citocina Th1 (HUNTER *et al.*, 1994). Esta citocina estimula a síntese de IL-12 por macrófagos, e também a liberação de NO e de metabólitos reativos de oxigênio. IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são citocinas inflamatórias críticas na resistência ao *T. gondii* (SUZUKI *et al.*, 1988; GAZZINELLI *et al.*, 1993a, 1993b; SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1996).

As células dendríticas são eficientes células apresentadoras de antígeno (APCs) e, quando ativadas, além de produzirem IL-12 e outras citocinas, aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras e respondem às quimiocinas, que promovem sua migração de tecidos periféricos para órgãos linfóides, onde induzem a diferenciação de células T *naïve* em células efectoras (SCOTT e HUNTER, 2002). Os macrófagos ativados produzem citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$ , e também são APCs. Portanto, macrófagos e células dendríticas atuam como elementos de ligação entre a imunidade inata e adquirida.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> atuam sinergisticamente para prevenir a reativação da infecção crônica, provavelmente através da produção de IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI *et al.*, 1991, 1992). Estas células são as principais fontes de IFN- $\gamma$ , citocina responsável pela resistência durante a fase crônica da infecção através da ativação de macrófagos, que promovem a morte intracelular do parasito (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1997).

Após a infecção por *T. gondii*, IL-10 exerce papel fundamental na regulação da produção de IFN- $\gamma$ , sendo este um dos meios de evitar a produção excessiva de citocinas capazes de lesar o hospedeiro (NEYER *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 2000).

Paradoxalmente, a resposta imune promove a sobrevivência de *T. gondii*, induzindo sua diferenciação de taquizoíta para bradizoíta, que forma uma parede cística que o protege dentro da célula hospedeira (BOHNE, HEESEMANN e GROSS, 1993, 1994).

## 1.2 Adesão e invasão de células hospedeiras por *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é capaz de penetrar ativamente em células fagocíticas ou não, formando o vacúolo parasitóforo dentro de 25 a 40 segundos (MORISAKI, HEUSER e SIBLEY, 1995). Antes da invasão, o parasito desliza (*gliding motility*) sobre substratos ou sobre a célula hospedeira, através da interação de suas proteínas, com receptores na superfície celular. Neste movimento, que é dependente de actina e miosina (DOBROWOLSKI e SIBLEY, 1996; DOBROWOLSKI, CARRUTHERS e SIBLEY, 1997; MEISSNER, SHLÜTER e SOLDATI, 2002; WETZEL *et al.*, 2003), *T. gondii* deixa uma trilha protéica que pode ser detectada usando-se anticorpos contra proteínas de sua superfície (SIBLEY, HÅKANSSON e CARRUTHERS, 1998; FERRO *et al.*, 1999). A invasão começa quando *T. gondii* adere à célula alvo pela sua extremidade apical, formando uma constrição no local da penetração por onde o parasito se move, até a completa formação do vacúolo parasitóforo, quando a constrição se fecha (MORISAKI, HEUSER e SIBLEY, 1995).

Durante a invasão, ocorre uma secreção seqüencial de proteínas de micronemas (MICs), roptrias e grânulos densos. As proteínas MIC atuam durante a adesão e invasão (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997), sendo sua descarga regulada por íons cálcio intracelulares livres (CARRUTHERS e SIBLEY, 1999). As proteínas de roptrias têm um papel importante na formação do vacúolo parasitóforo, enquanto as de grânulos densos o

modificam para aquisição de nutrientes da célula hospedeira (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997).

Pouco se sabe a respeito de moléculas do parasito envolvidas no reconhecimento da superfície da célula hospedeira e de receptores celulares que mediem a adesão/invasão do *Toxoplasma*. A capacidade de *T. gondii* infectar uma ampla variedade de células sugere o seu reconhecimento por receptor(es) ubíquo(s) na superfície celular ou a presença de diversas moléculas de adesão no parasito, capazes de reconhecer múltiplos receptores na célula hospedeira. As proteoglicanas, uma classe de glicoproteínas com uma ou mais cadeias lineares de glicosaminoglicanas (GAGs) ligadas covalentemente a um núcleo protéico, podem ser importantes na adesão do parasito, já que são expressas na superfície de todas as células de mamíferos e fazem parte da matriz extracelular. GAGs são polissacarídeos lineares, constituídos de unidades repetidas de dissacarídeos (*N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina ligado a um ácido urônico) variavelmente sulfatados. Heparina e heparan sulfato, são duas GAGs que diferem apenas no grau de sulfatação e de epimerização (WIGHT, HEINEGÅRD e HASCALL, 1991).

Estudos diversos mostram que vírus, bactérias, protozoários e helmintos utilizam proteoglicanas da superfície da célula como receptores para adesão, possibilitando a primeira etapa de uma infecção. Vários autores já mostraram o envolvimento, as vezes fundamental, da heparina/heparan sulfato na infecção por vírus como, por exemplo, vírus herpes simplex tipo 1 (SHUKLA *et al.*, 1999; TRYBALA *et al.*, 2002), vírus da febre amarela (GERMI *et al.*, 2002), vírus da dengue tipo 2 e vírus da encefalite japonesa (LIN *et al.*, 2002). A adesão de *Mycobacterium tuberculosis* às células epiteliais ou à matriz extracelular, ocorre através da interação de uma hemaglutinina de sua superfície com glicoconjugados sulfatados (MENOZZI *et al.*, 1996). GAGs sulfatadas estão implicadas na adesão de *Borrelia burgdorferi* à superfície de células hospedeiras (PARVEEN *et al.*, 2003). Maruyama *et al.*

(2000) mostraram que GAGs sulfatadas são capazes de se ligar tanto às substâncias de adesão de vermes adultos de *Strongyloides venezuelensis* quanto às suas enzimas proteolíticas, ambas necessárias à invasão das células epiteliais do intestino. Estudos sobre a malária mostraram que GAGs sulfatadas podem inibir a ligação de esporozoítas aos hepatócitos (PINZON-ORTIZ *et al.*, 2001) e também a adesão de eritrócitos infectados a eritrócitos não infectados, para formação de rosetas (BARRAGAN *et al.*, 2000; HEDDINI *et al.*, 2001). Experimentos com as formas promastigotas de *Leishmania donovani* sugerem que a heparina poderia atuar como ponte entre as proteínas do parasito e as do hospedeiro, aumentando sua interação (BUTCHER *et al.*, 1992). *Chlamydia trachomatis* depende de um ligante semelhante a heparan sulfato, na sua superfície, para aderir e invadir células alvo (ZHANG e STEPHENS, 1992). Ruiz-Bustos *et al.* (2001) isolaram e caracterizaram proteínas da membrana externa de *Helicobacter pylori* com afinidade por proteoglicanas heparan sulfato, que podem estar envolvidas na adesão a receptores nas células da mucosa do estômago. Experimentos utilizando açúcares e glicoproteínas, bem como proteoglicanas, mostraram a importância destas moléculas na adesão/invasão de *T. gondii*, de forma similar à já relatada para outros parasitos (FURTADO *et al.* 1992a; FURTADO, CAO e JOINER, 1992b; MINEO *et al.* 1993; ORTEGA-BARRIA E BOOTHROYD, 1999; CARRUTHERS *et al.*, 2000; BRECHT *et al.*, 2001; JACQUET *et al.*, 2001).

Os taquizoítas possuem uma superfície composta principalmente por antígenos glicolipídicos e protéicos (TOMAVO, DUBREMETZ e SCHWARTZ, 1992; BOOTHROYD *et al.*, 1998). Pelo menos quatro principais antígenos protéicos foram identificados na superfície dos taquizoítas, sendo denominados antígenos de superfície 1, 2, 3 e 5 (SAG-1, SAG-2, SAG-3 e SAG-5), com pesos moleculares de 30kDa, 22kDa, 43kDa e 35kDa, respectivamente (BONHOMME *et al.*, 1999). Várias proteínas de sequência relacionada a SAG-1 (SRS) também já foram identificadas e clonadas (MANGER, HEHL e

BOOTHROYD, 1998). Todas estas proteínas são ancoradas à superfície dos taquizoítas via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BOOTHROYD *et al.*, 1998). Dentre estas proteínas constitutivamente expressas na superfície do parasito, SAG-1 e SAG-3 mostraram envolvimento na adesão/invasão da célula hospedeira. Na presença de glicosamida-soro albumina bovina (BSA), uma neoglicoproteína, a inibição da infecção por *T. gondii* deficiente em SAG-1 foi significativamente menor do que a inibição por *T. gondii* expressando SAG-1. Isto sugere que esta proteína de superfície, provavelmente se ligue a receptores glicosilados na célula hospedeira (MINEO *et al.*, 1993). Experimentos usando anticorpos anti-SAG-1 mostraram inibição da invasão da célula hospedeira, provavelmente pela interferência na adesão dos taquizoítas (MINEO *et al.*, 1993; MINEO e KASPER, 1994; VELGE-ROUSSEL *et al.*, 2001). Entretanto, parasitos deficientes em SAG-1 ainda conseguem invadir células alvo, sugerindo que a adesão de *T. gondii* não depende somente de SAG-1 (MINEO *et al.*, 1993). Estudo com *Toxoplasma* deficiente em SAG-3, relata diminuição na infectividade relacionada com a redução na adesão à célula hospedeira, sugerindo que SAG-3 pode mediar a ligação na célula alvo (DZIERSZINSKI *et al.*, 2000). Experimentos realizados por Jacquet *et al.* (2001) mostraram evidências de que SAG-3 se liga a heparan sulfato na superfície da célula hospedeira.

As proteínas de micronemas, que diferentemente das proteínas constitutivas são secretadas no polo apical de *T. gondii* no momento da adesão/invasão, revelaram-se críticas na motilidade do parasito. MIC1 apresenta dois domínios semelhantes a trombospondina-1 (TSP-1) degenerados e demonstrou ser capaz de se ligar a células hospedeiras (FOURMAUX *et al.*, 1996b). MIC2 tem seis domínios tipo TSP-1 e um domínio I semelhante a integrina (WAN *et al.*, 1997). Em 1997, Carruthers e Sibley sugeriram que um ou ambos domínios poderiam ser responsáveis pela atividade de ligação à célula hospedeira demonstrada para MIC2. Esta proteína é redistribuída para a parte posterior do taquizoíta, durante a penetração

na célula, e ensaios estimulando ou bloqueando a secreção de MIC2 demonstraram sua estreita correlação com a invasão do parasito (CARRUTHERS, GIDDINGS e SIBLEY, 1999). MIC3 possui vários domínios de adesão semelhantes a EGF (*epidermal growth factor-like domains*) (FOURMAUX *et al.*, 1996a). Experimentos mostraram que a exocitose desta proteína ocorre na região apical, no início do processo de invasão, e que, da mesma forma relatada por Carruthers e Sibley (1999) para MIC2, MIC3 é redistribuída na superfície do taquizoíta, em direção à extremidade posterior, na medida em que o parasito penetra na célula (GARCIA-RÉGUET *et al.*, 2000). Brecht *et al.* (2001) identificaram e caracterizaram MIC4, que possui seis domínios de adesão do tipo *apple* mostrando alta homologia com a proteína de micronema de *Sarcocystis muris*, denominada SML, que reconhece *N*-acetilgalactosamina como açúcar principal. Ensaios de inibição na presença de concentrações crescentes de carboidratos mostraram um efeito bifásico sobre a ligação de MIC4 à célula hospedeira. Baixas concentrações aumentaram a ligação, mas altas doses resultaram em ligação mínima.

Laminina da célula hospedeira mostrou-se capaz de mediar a ligação de taquizoítas ao receptor desta glicoproteína, a integrina  $\alpha 6 \beta 1$ , em células de ovário de hamster chinês (CHO) e em fibroblastos humanos (FURTADO *et al.* 1992; FURTADO, CAO e JOINER, 1992). Resíduos de ácido siálico mostraram-se importantes para a penetração de *Toxoplasma* (MONTEIRO, SOARES e DE SOUZA, 1998). Ortega-Barria e Boothroyd (1999) identificaram atividade tipo lectina em lisado de *T. gondii*, aglutinando eritrócitos e se ligando a polissacarídeos sulfatados. GAGs sulfatadas solúveis em baixa concentração aumentaram a infectividade de taquizoítas, enquanto que em altas concentrações, a inibiram. Células hospedeiras deficientes na expressão de proteoglicanas heparan sulfato, ou com a biossíntese de GAGs inibida, também tiveram a infectividade reduzida. Várias moléculas potencialmente ligantes de heparina foram identificadas, porém sua localização no parasito e seu exato papel na adesão não foram determinados. Carruthers *et al.* (2000) também observaram que baixas

concentrações de GAGs aumentavam a adesão e altas concentrações bloqueavam a invasão de *Toxoplasma* em diferentes linhagens de células hospedeiras.

Estes relatos ilustram a diversidade de estratégias utilizadas pelo *Toxoplasma gondii* para interagir com o hospedeiro e, apesar de poucas moléculas já terem sido identificadas, é evidente a indicação de que esta interação é parcialmente mediada por GAGs sulfatadas.

Por todas as conseqüências adversas que a toxoplasmose pode ocasionar, tanto os meios de prevenção, diagnóstico e tratamento, assim como o desenvolvimento de drogas que possam evitar a adesão e invasão de células hospedeiras por *T. gondii*, são muito importantes. Estudos envolvendo os mecanismos de adesão do parasito podem levar à descoberta de sítios/moléculas alvo que possam ajudar a controlar a disseminação parasitária e suas conseqüências.



## ***2- OBJETIVO***

Este estudo teve como objetivo identificar proteínas ligantes de heparina envolvidas no processo de adesão de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* à célula hospedeira.

### ***3- MATERIAL E MÉTODOS***

### 3.1 Obtenção de taquizoítas *in vivo*

Taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* foram mantidos por passagens intraperitoneais em camundongo Swiss, injetando-se  $10^7$  parasitos suspensos em 400 $\mu$ L de salina tamponada com fosfatos (PBS – 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,2, estéril. Após 48 horas, os parasitos foram coletados por lavagem da cavidade peritoneal, com 4mL de PBS. Os lavados foram observados sob microscopia de luz, selecionando-se aqueles com a maior quantidade de parasitos e o menor número de células. Em seguida, os taquizoítas foram separados de células hospedeiras, por centrifugação em baixa rotação (75 x g), durante 5 minutos, e lavados duas vezes por centrifugação a 800 x g, durante 10 minutos, com PBS. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada por exclusão com Azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA), sendo consideradas somente as amostras com viabilidade superior a 95%. Os sedimentos foram congelados até o momento dos ensaios ou utilizados para infecção de células em cultura. Quando presentes, as hemácias foram removidas incubando-se o sedimento a 37°C, por 3 minutos, em tampão de lise (nove partes de NH<sub>4</sub>Cl a 0,16M e uma parte de Tris/HCl a 0,17M, pH 7,65) e realizando-se subsequentes lavagens com PBS. Para remover proteínas do hospedeiro ionicamente associadas à superfície dos parasitos, os taquizoítas foram incubados com NaCl a 1,0M, durante 15 minutos, a 4°C, sob agitação lenta, e novamente sedimentados após lavagem com PBS.

### 3.2 Obtenção de taquizoítas *in vitro*

Células HFF (*human foreskin fibroblast* – ATCC CRL 1635, Hs68) foram cultivadas em frascos para cultura de tecido de 75cm<sup>2</sup> (Costar Corporation, Cambridge, MA, USA), em 10mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) inativado por aquecimento, 100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (GIBCO BRL; Life Technologies, Rockville, Maryland, USA). Essas células foram mantidas a 37°C, em câmara úmida, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, e foram sub-cultivadas por tripsinização (Trypsin-EDTA, GIBCO; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Monocamadas subconfluentes de HFF foram infectadas com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, obtidos a partir de lavado peritoneal de camundongos, na proporção de dez taquizoítas por célula. Após a liberação dos parasitos das células, os sobrenadantes contendo taquizoítas foram coletados e processados como descrito anteriormente (CHATTERTON *et al.*, 2002) ou utilizados para infectar novas células.

### 3.3 Preparação de antígenos

Para obter proteínas solúveis de taquizoítas, os parasitos foram lisados com Triton X-100 (Sigma) a 1%, em tampão Tris (150mM NaCl, 50mM Tris, 0,003% 2-mercapto-etanol), pH 7,5, por 1 hora, a 37°C, na presença de inibidores de proteases (Complete™ Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Utilizou-se 1,0mL de tampão para 1 x 10<sup>8</sup> parasitos. As proteínas solúveis foram então obtidas por centrifugação a 2.500 x g, durante 5 minutos e a concentração protéica foi obtida por uma modificação do método de Lowry (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os sobrenadantes foram estocados a -20°C, até serem utilizados nos ensaios.

### 3.4 Isolamento de proteínas ligantes de heparina

As proteínas ligantes de heparina foram isoladas a partir de sobrenadantes de lisados de *Toxoplasma*, obtidos da cavidade peritoneal de camundongos ou de HFF em cultura. Amostras contendo em média 2mg/mL de proteínas foram submetidos a cromatografia de afinidade, em coluna de heparina imobilizada em gel de agarose (Affi-gel Heparin, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), previamente equilibrada com PBS, a 4°C. Em seguida, a coluna foi lavada com PBS, até a densidade óptica (DO) do lavado se igualar à leitura do tampão de equilíbrio (PBS). Os ligantes de heparina foram então eluídos com gradiente descontínuo de NaCl (0,5M, 1,0M, 1,5M e 2,0M) e, finalmente, concentrados e dialisados em filtro Amicon YM-10 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Como controle, sobrenadante de lisado de *Toxoplasma*, coletado da cavidade peritoneal de camundongo, foi aplicado à coluna de agarose (GIBCO BRL), eluído, concentrado e dialisado, como descrito acima. Também como controle, exsudatos de camundongos não infectados foram coletados e processados da mesma forma que os exsudatos com taquizoítas. As amostras foram estocadas a -20°C.

### 3.5 Biotinilação de heparina-albumina e de albumina

A 1.500µL de uma solução aquosa contendo 1.500µg de heparina-albumina (Sigma) foram adicionados 38µL de uma solução de N-hidroxi-succinimidobiotina (Sigma) a 10mg/mL, em dimetil-sulfóxido (DMSO; Riedel-deHaën, Seelze, Germany). Esta mistura foi incubada durante 4 horas, à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após a adição de 30µL de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) a 1,0M e um período de incubação de 10 minutos, à

temperatura ambiente, a solução foi colocada em membrana de *cut-off* 12kDa (Sigma) e dialisada contra PBS, durante 48 horas, a 4°C, procedendo-se a três trocas do tampão neste período. A solução foi dividida em alíquotas e estocada a 4°C. Como controle, albumina (BSA – Sigma) também foi biotinilada como descrito acima.

### **3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferência**

Para determinar o perfil protéico, a fração ligante de heparina foi submetida a análise por SDS-PAGE a 17%, de acordo com Laemmli (1970). As proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl a 0,1 M, pH 6,8, com 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20 % de glicerol) com ou sem 2-mercapto-etanol e, após serem ou não aquecidas durante 5 minutos, a 95°C, foram aplicadas ao gel. Ao final da eletroforese, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie (0,1% de Coomassie Blue R-250, 50% de metanol e 10% de ácido acético em solução aquosa), ou com nitrato de prata (0,2% de AgNO<sub>3</sub> e 0,075% de formaldeído em solução aquosa), ou então eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose de 0,45µm de porosidade (Millipore) ou membrana de polivinilidene-difluoreto (PVDF; Millipore).

### **3.7 Western-blotting**

Para confirmar a especificidade da ligação com a heparina, a membrana de nitrocelulose contendo proteínas ligantes de heparina foi bloqueada com PBS contendo 1% de

BSA durante 18 horas, a 4°C, sob agitação lenta, a fim de se eliminar ligações inespecíficas. Após ser incubada durante 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação lenta, com heparina-albumina-biotinilada (conforme item 5) diluída a 1:400, com Tween-20 0,05% (v/v) em PBS (tampão de lavagem), ela foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e uma vez com Tris-HCl a 0,05M, pH 7,6. A membrana foi incubada novamente por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação lenta, com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), diluído a 1:50, em Tris-HCl 0,05M, pH 7,6, lavada três vezes com tampão de lavagem, e uma vez com PBS. Finalmente, as bandas ligantes de heparina foram reveladas por quimioluminescência (ECL™ Western Blotting Detection Reagents e Hyperfilm™ ECL™ – Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Como controle, paralelamente foi realizado o mesmo procedimento usando albumina biotinilada.

### 3.8 Seqüenciamento N-terminal

As proteínas transferidas para membrana PVDF foram coradas com Azul Brilhante de Coomassie e, as bandas de peso molecular aparente de 5kDa e de 13kDa foram excisadas e encaminhadas para seqüenciamento N-terminal de proteínas, pelo método de degradação de Edman, no Laboratório do Prof. Dr. Lewis Joel Greene (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP).

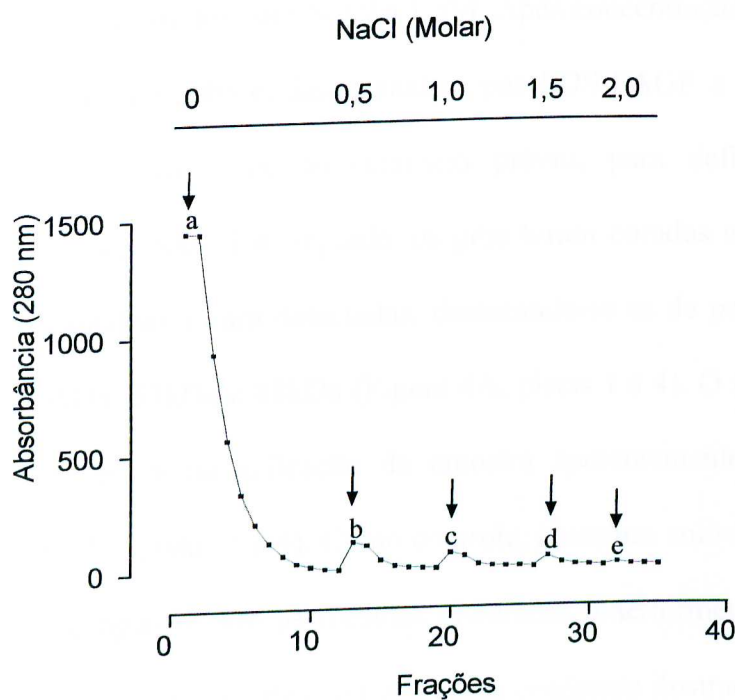


## ***4- RESULTADOS***

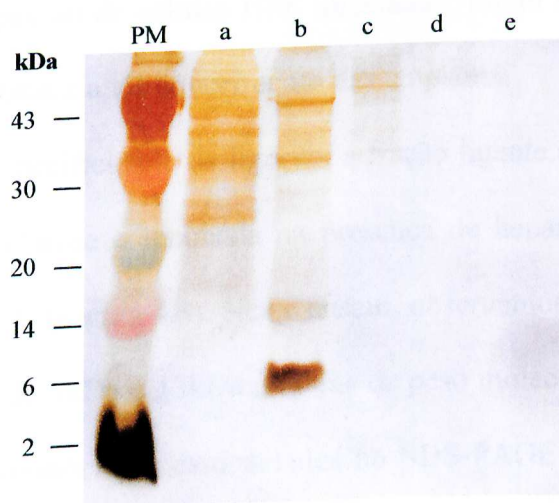
#### 4.1 Isolamento de proteínas ligantes de heparina

Para definir a concentração de NaCl mais adequada para eluir as proteínas ligantes de heparina, taquizoítas coletados da cavidade peritoneal de camundongos infectados foram lisados com Triton X-100, aplicados em coluna de heparina imobilizada em agarose e eluídos com gradiente descontínuo de NaCl (0,5M, 1,0M, 1,5M e 2,0M) em PBS. Após concentração e diálise das frações eluídas, elas foram submetidas a SDS-PAGE a 17% e coradas com nitrato de prata. A Figura 3A demonstra o perfil cromatográfico do fracionamento de lisado de *T. gondii*. Nesse painel, observamos a presença de cinco picos (a-e). O primeiro corresponde ao volume excluído, proteínas não ligantes de heparina. Os picos de b até e, correspondem a frações eluídas com NaCl em concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0M, respectivamente. O volume excluído mostrou algumas bandas de peso molecular variado (Figura 3B, pista a). A maioria das proteínas ligantes de heparina foi eluída com NaCl a 0,5M (Figura 3B, pista b). Com NaCl a 1,0M poucas bandas ainda foram visíveis (Figura 3B, pista c) e com NaCl a 1,5M apenas uma sombra foi notada (Figura 3B, pista d). Quando a eluição foi com NaCl a 2,0M, não apareceram bandas no gel (Figura 3B, pista e), praticamente, não se detectou absorbância (0,05). Assim, confirmou-se que a concentração de 1,5M era a mais adequada para os ensaios posteriores.

A



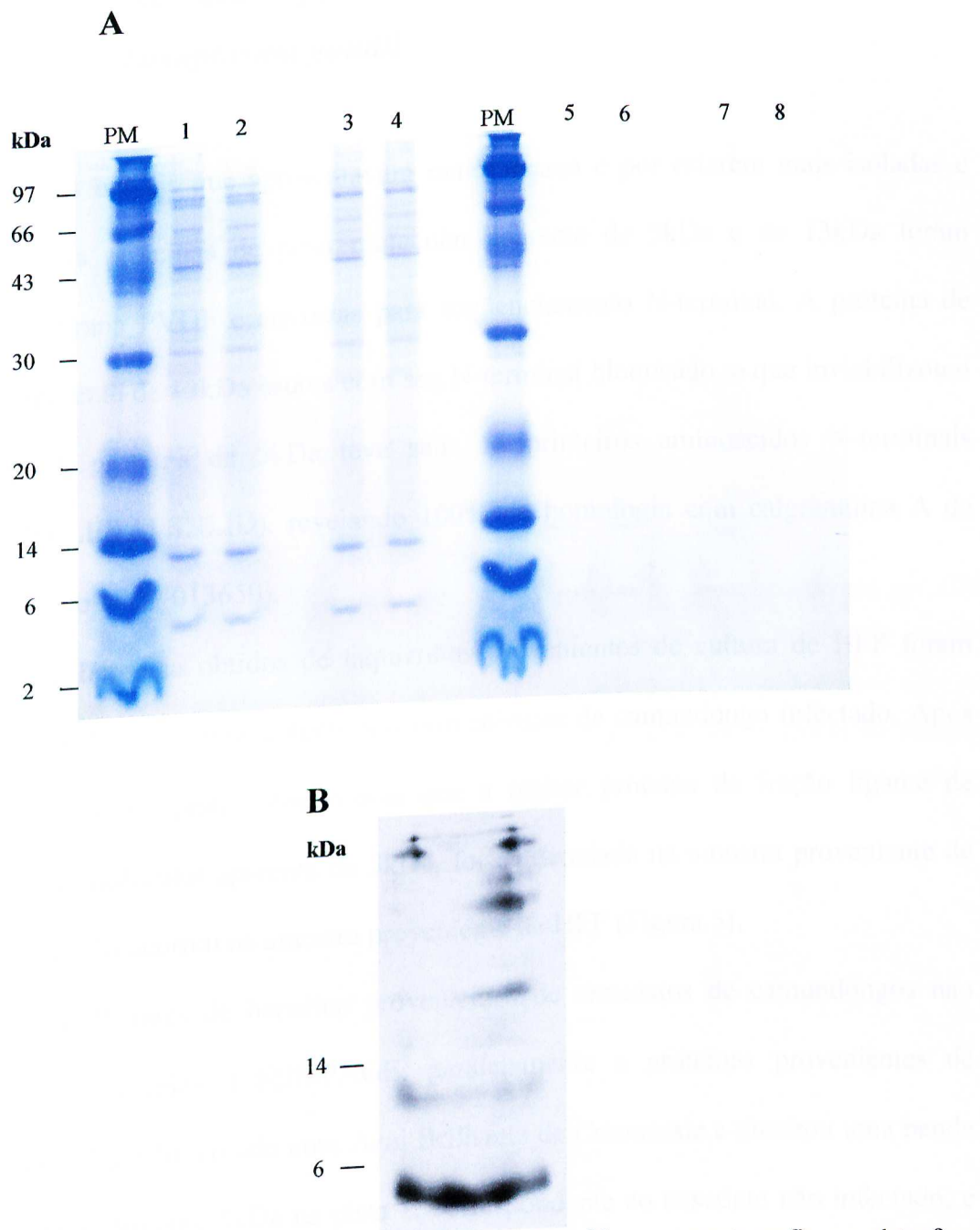
B



**Figura 3.** Cromatografia de afinidade em coluna de heparina imobilizada em gel agarose, utilizando-se gradiente descontínuo de NaCl. (A) Cromatograma das frações eluídas em concentrações crescentes de NaCl: (a) pico do volume excluído (PBS); (b-e) picos de eluatos NaCl nas concentrações 0,5, 1, 1,5 e 2M, respectivamente. (B) Análise eletroforética, em gel a 17%, dos eluatos a-e. Coloração pelo nitrato de prata. PM: padrão de peso molecular

Com a finalidade de identificar os ligantes de heparina, taquizoítas coletados de camundongos infectados foram lisados com Triton X-100, aplicados em coluna de heparina imobilizada em agarose e eluídos com NaCl a 1,5M. Após concentração e diálise, as proteínas ligantes de heparina foram submetidas a análise por SDS-PAGE a 17%, na presença ou ausência de agente redutor e de aquecimento prévio, para definir as condições de processamento mais adequadas. Em seguida, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie. Várias proteínas foram detectadas, destacando-se as de peso molecular aparente de 5kDa, 13kDa, 33kDa, 53kDa e 88kDa (Figura 4A, pistas 1 a 4). O tratamento com agente redutor ou a fervura antes da aplicação da amostra aparentemente não afetou o perfil eletroforético (Figura 4A, pistas 1 a 4). Como controle, proteínas solúveis de *T. gondii* foram aplicadas à coluna de agarose sob as mesmas condições anteriormente descritas. Nenhum ligante de agarose (ligação inespecífica) foi detectado conforme ilustrado na Figura 4A, pista 5 a 8. As proteínas eluídas nos experimentos seguintes, a partir de lisados de taquizoítas coletados de camundongos ou de células HFF infectadas, foram submetidas a SDS-PAGE a 17% em condições redutoras e após aquecimento das amostras.

Para verificar a especificidade da ligação, a fração ligante de heparina foi imobilizada em membrana de nitrocelulose e incubada na presença de heparina-albumina biotinilada e revelada pelo sistema ECL (Figura 4B). Neste ensaio, observamos a marcação das bandas de peso molecular aparente de 5kDa e 13kDa e outras de peso molecular superior. As bandas de 5kDa e de 13kDa correspondem às evidenciadas no SDS-PAGE (Figura 4A, pistas 1 a 4). Como controle, a fração ligante de heparina também foi incubada com albumina biotinilada, não mostrando nenhuma marcação após revelação por quimioluminescência.



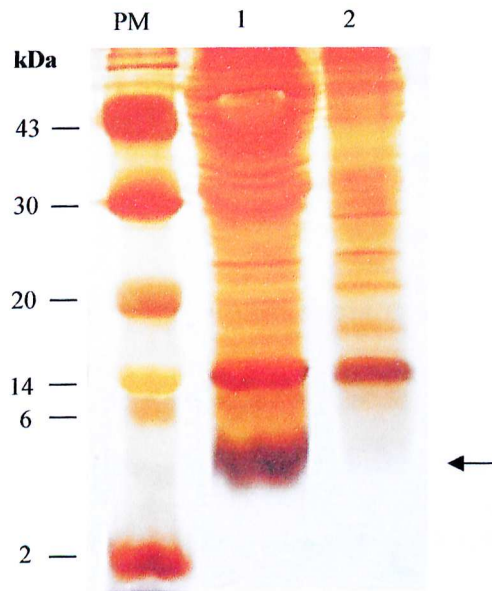
**Figura 4.** Análise de proteínas solúveis de *T. gondii* submetidas a cromatografia e a eletroforese em diferentes condições. (A) Nas pistas 1 e 2, em condições redutoras, com ou sem fervura, respectivamente. Nas pistas 3 e 4, em condições não redutoras, com ou sem fervura, respectivamente. Nas pistas 5-6 e 7-8, eluatos obtidos de coluna de agarose (controle), analisados sob as mesmas condições acima por SDS-PAGE a 17%. Coloração pelo Azul Brilhante de Coomassie. PM: padrão de peso molecular. (B) Fração ligante de heparina eluída da coluna de afinidade, submetida a eletroforese em gel a 17% e transferida para membrana de nitrocelulose, seguida de incubação com heparina biotinilada e revelação por quimioluminescência

## 4.2 Identificação de uma proteína de camundongo associada aos taquizoítas de *Toxoplasma gondii*

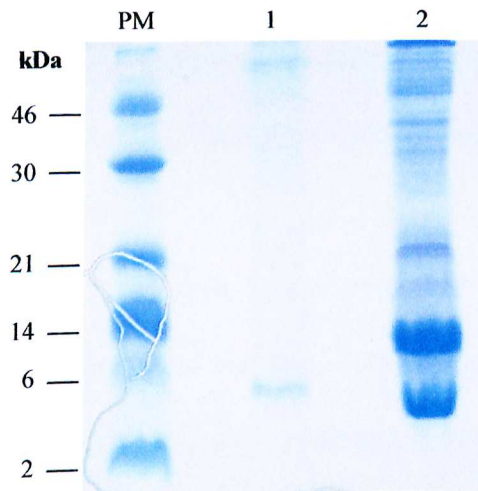
Por serem as bandas que apresentavam maior massa e por estarem mais isoladas e definidas no gel, as proteínas de peso molecular aparente de 5kDa e de 13kDa foram excisadas da membrana PVDF e enviadas para seqüenciamento N-terminal. A proteína de peso molecular aparente de 13kDa estava com seu N-terminal bloqueado, o que inviabilizou o seqüenciamento. A proteína de 5kDa teve seus 13 primeiros aminoácidos N-terminais seqüenciados (PSELEKALSNLID), revelando 100% de homologia com calgranulina A de camundongo (Acesso NM\_013650).

Ligantes de heparina obtidos de taquizoítas provenientes de cultura de HFF foram analisados em SDS-PAGE, paralelamente aos provenientes de camundongo infectado. Após coloração com nitrato de prata, observou-se que a menor proteína da fração ligante de heparina, com peso molecular aparente de 5kDa, foi evidenciada na amostra proveniente de camundongo, e isto não ocorreu na amostra proveniente de HFF (Figura 5).

As proteínas ligantes de heparina provenientes de exsudatos de camundongos não infectados foram submetidas a SDS-PAGE, paralelamente a proteínas provenientes de exsudato infectado. O gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie e mostrou uma banda na altura de aproximadamente 5kDa na pista 1, correspondente ao exsudato não infectado, e uma banda corada intensamente na pista 2, do exsudato infectado (Figura 6).



**Figura 5.** (A) Calgranulina A não está presente em lisados de *T. gondii* cultivados em HFF. Lisados de *T. gondii* colhidos de camundongo Swiss (pista 1) ou cultivados em HFF (pista 2) foram aplicados em coluna de afinidade de heparina, eluídos e analisados por SDS-PAGE a 17%. Observa-se a ausência de calgranulina A no lisado de parasitos provenientes de HFF (pista 2, seta). Coloração pelo nitrato de prata. PM: padrão de peso molecular



**Figura 6.** Controle com células de lavado peritoneal de camundongo. As amostras foram submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de heparina, eluídas e analisadas por SDS-PAGE a 17%. Na pista 1, amostra proveniente de camundongo não infectado; na pista 2, amostra de camundongo infectado com *T. gondii*. Coloração pelo Azul Brillante de Coomassie. PM: padrão de peso molecular

## ***5- DISCUSSÃO***



A adesão de *Toxoplasma gondii* à célula alvo precede a invasão e a formação do vacúolo parasitóforo, que permite a sobrevivência do parasito e a realização de seu ciclo lítico no hospedeiro. Além disso, a adesão é importante na motilidade, que permite ao *Toxoplasma* disseminar-se pelos tecidos, cruzar ativamente barreiras e atingir locais como a placenta e o cérebro (BARRAGAN e SIBLEY, 2002). Sabe-se que a matriz extracelular desempenha um papel na adesão, tanto para a invasão como para a migração do parasito, mas até hoje pouco se sabe sobre as moléculas que estão envolvidas no processo.

Furtado, Cao e Joiner (1992) e Furtado *et al.* (1992) mostraram que a laminina media a interação entre taquizoítas e a célula hospedeira, formando uma ponte entre ambos. Ortega-Barria e Boothroyd (1999), procurando proteínas de *T. gondii* que se ligassem a glicoconjugados na superfície da célula hospedeira, encontraram atividade lectínica para polissacarídeos sulfatados somente na membrana e no citoesqueleto do parasito. Esses autores mostraram também que células deficientes na síntese de proteoglicanas sulfatadas ou nas reações de sulfatação tinham a taxa de infectividade por *T. gondii* significativamente reduzida. Além disso, glicoconjugados solúveis como heparina e dextran sulfato (polissacarídeo sintético) aumentavam ou diminuíam a infectividade quando em baixas ou altas concentrações, respectivamente.

Mineo *et al.* (1993) observaram que, na presença de BSA-glicosamida, a inibição da infectividade foi significativamente maior em cepas de *Toxoplasma* expressando SAG-1 do que em cepas mutantes, deficientes em SAG-1. Isto sugere que SAG-1 poderia ligar-se a um receptor glicosilado na superfície da célula hospedeira. Jacquet *et al.* (2001) demonstraram que SAG-3 e não SAG-1 interage especificamente com proteoglicanas sulfatadas. Somente SAG-3 foi capaz de se ligar à heparina imobilizada, e ensaios com células deficientes em proteoglicanas ou na sulfatação de suas proteínas mostraram mais de 70% de redução na ligação a SAG-3. Em 2000, Carruthers *et al.* realizaram ensaios com diferentes células,

evidenciando que *T. gondii* utiliza GAGs sulfatadas para aderir ao substrato e à célula alvo. Tanto a motilidade quanto a adesão foram inibidas por GAGs sulfatadas solúveis. De maneira similar ao resultado encontrado por Ortega-Barria e Boothroyd (1999) ao usarem diferentes concentrações de GAGs, os autores também observaram o mesmo efeito bifásico: baixas doses aumentaram a adesão e dose maiores a diminuíram. Ambos os trabalhos sugerem que moléculas solúveis de GAGs poderiam atuar como ponte, ligando o parasito a receptores na superfície celular ou, ainda, ligando diretamente uma proteína com atividade lectínica do *Toxoplasma* com proteoglicanas da superfície da célula alvo. Tanto heparina quanto dextran sulfato e outras GAGs sulfatadas foram capazes de inibir a infectividade do parasito. Isto sugere que provavelmente *T. gondii* pode usar uma variedade de açúcares sulfatados para aderir a diferentes tipos de células. Botero-Kleiven *et al.* (2001) mostraram a interação de heparina com a superfície de taquizoítas vivos extracelulares, além de observarem que esta GAG era internalizada pelo parasito, sendo localizada em vesículas intracelulares pouco tempo após serem expostas a seus ligantes.

Confirmando a importância da sulfatação, Ortega-Barria e Boothroyd (1999) e Jacquet *et al.* (2001) relatam que nos ensaios de competição, GAGs com menor grau de sulfatação como condroitin sulfato A ou C, GAGs também presentes na matriz extracelular, não tiveram a mesma capacidade de inibir a ligação com heparina mostrada por heparan sulfato e dextran sulfato. O fato de dextran sulfato, um polissacarídeo aniônico que atua como um análogo da heparina, competir com heparina/heparan sulfato sugere que as interações entre o parasito e GAGs sulfatadas podem envolver o reconhecimento de uma superfície com alta densidade de cargas negativas, fornecida pelos íons sulfato, e uma conformação semelhante a heparina, mais do que uma interação específica com o receptor, como sugerido para *Plasmodium falciparum* (CLARK *et al.*, 1997).

Com base nesses dados e em relatos de uma variedade de outros microrganismos patogênicos que se ligam a heparina ou outras GAGs sulfatadas, como estratégia para reconhecer, aderir e invadir células do hospedeiro, buscamos identificar proteínas ligantes de heparina envolvidas na adesão de *Toxoplasma gondii* à célula alvo. Como proteínas do citosol não apresentaram atividade lectínica para polissacarídeos sulfatados (ORTEGA-BARRIA e BOOTHROYD, 1999), utilizamos sobrenadante de lisado de *Toxoplasma* aplicado a heparina imobilizada em agarose, como meio de obtermos estas proteínas. Verificamos a ausência de ligação inespecífica a agarose, e também confirmamos a especificidade da ligação a heparina. Das proteínas analisadas por SDS-PAGE a 17%, selecionamos as duas que apresentavam maior massa e estavam mais isoladas, favorecendo assim sua excisão e seqüenciamento. Estas proteínas tinham peso molecular aparente de 5kDa e 13kDa. Esta última apresentou N-terminal bloqueado e não pôde ser seqüenciada. Entretanto, a proteína aparentando 5kDa foi identificada como sendo calgranulina A de camundongo.

O fato de selecionarmos os exsudatos coletados de camundongos infectados que apresentavam menos de 1% de células do hospedeiro e de utilizarmos NaCl a 1,0M para dissociar proteínas ionicamente ligadas ao parasito, não impediu que a calgranulina A se mantivesse associada, talvez por interações hidrofóbicas, à membrana dos taquizoítas. Como a calgranulina A mostrou ser ligante de heparina e, provavelmente, estava adsorvida à membrana do parasito, parece sugestivo que ela possa atuar como uma ponte entre o *Toxoplasma* e a superfície da célula alvo. Assim, além de suas próprias proteínas, o parasito poderia utilizar esta proteína solúvel do hospedeiro como mais uma de suas estratégias de adesão.

Calgranulina A (S100A8 ou MRP8) pertence à família de proteínas S100, que se caracterizam por apresentarem dois sítios ligantes de cálcio. Geralmente esta proteína é encontrada formando heterodímero com outra proteína S100, a calgranulina B (S100A9 ou

MRP14). Os complexos S100A8/A9 ou (S100A8/A9)<sub>2</sub> parecem ser as estruturas funcionalmente relevantes destas proteínas (HUNTER e CHAZIN, 1998; KERKHOFF, KLEMPPT e SORG, 1998). Elas estão presentes exclusivamente em vertebrados, sendo expressas constitutivamente em neutrófilos, onde representam cerca de 40% das proteínas do citosol. Também estão presentes em macrófagos, células endoteliais e microglia quando ativados (DONATO, 2001; NACKEN *et al.*, 2003).

Uma das vias de secreção dessas proteínas é pela elevação do nível de cálcio intracelular, induzida em fagócitos pelo contato com células endoteliais ativadas. Inversamente, o contato com células endoteliais em repouso inibe a secreção (FROSCH *et al.*, 2000). S100A8/A9 liberadas de fagócitos ativados atuam no recrutamento de leucócitos. O complexo se liga a proteoglicanas heparan sulfato das células endoteliais, promovendo seu acúmulo na superfície destas células (ROBINSON *et al.*, 2002) e, além disto, neutrófilos ativados ligam-se a glicanas carboxiladas, expressas constitutivamente nas células do endotélio, através destas duas proteínas (SRIKRISHNA *et al.*, 2001). Simultaneamente, S100A9 estimula a adesão de neutrófilos mediada por integrina  $\beta_2$  (NEWTON e HOGG, 1998). S100A8 murino é um potente quimiotático para neutrófilos e macrófagos (GECZY, 1996).

Durante a inflamação, as calgranulinas S100A8 e S100A8/A9 são secretadas para o espaço extracelular, onde podem inibir a proliferação de linfócitos ativados por mitógenos e ter um efeito modulatório na inflamação (DONATO, 2001). S100A8/A9 se liga ao ácido araquidônico, promovendo sua translocação para o citoesqueleto e para a membrana plasmática de fagócitos, durante o processo inflamatório (ROULIN *et al.*, 1999). Neste trabalho detectou-se calgranulina A na membrana de taquizoítas somente quando os parasitos se multiplicaram no modelo experimental murino, onde poderia estar sendo secretada pelas células inflamatórias do exsudato peritoneal e, então, se ligado a membranas de taquizoítas.

Isto justifica o fato de esta proteína não ter sido evidenciada em amostra proveniente de HFF, ao ser analisada por SDS-PAGE.

Os experimentos realizados neste trabalho não permitiram esclarecer se calgranulina A estava na forma monomérica ou dimérica, inclusive como S100A8/A9, antes do processamento. Existe a possibilidade, de que estando na forma heterodimérica, possa interagir com glicanas carboxiladas ou com proteoglicanas heparan sulfato do endotélio, contribuindo para a adesão do parasito, de maneira semelhante a que ocorre com os fagócitos (SRIKRISHNA *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2002). Outra possibilidade seria a de que se ligando a este complexo, os taquizoítas estariam diminuindo disponibilidade de S100A8/A9 extracelular e interferindo no tráfego de fagócitos para o local da infecção. Se esta proteína for internalizada pelo parasito, talvez junto com proteoglicanas heparan sulfato (BOTERO-KLEIVEN *et al.*, 2001), ela poderia carrear cálcio para o meio intracelular e, assim, colaborar no processo de invasão.

Ainda pouco se conhece a respeito do papel das proteínas S100A8 e S100A9 (DONATO, 2001; NACKEN *et al.*, 2003), o que dificulta a compreensão do significado de sua ligação à membrana de taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. Experimentos para mostrar a ligação da proteína S100A8 à célula hospedeira, a forma em que ela se apresenta ao fazer esta ligação e ensaios de inibição são alguns dos passos necessários para que se possa analisar estas sugestões.

Os dados ora obtidos evidenciam a importância do presente trabalho, uma vez que na maioria dos estudos até hoje se têm cultivado *T. gondii* em fibroblastos ou utilizado estratégias para marcação específica de proteínas do parasito. Isto dificulta uma apreciação sobre a possibilidade de taquizoítas de *Toxoplasma* fazerem uso de proteínas solúveis do hospedeiro, que sejam ligantes de heparina, como um de seus mecanismos de adesão. Este

trabalho sugere uma interação entre calgranulina A solúvel e a membrana de taquizoítas contribuindo para a adesão do parasito às células hospedeiras, via heparina/heparan sulfato.

## ***6- CONCLUSÕES***

1. A proteína calgranulina A está presente, de forma evidente, em exsudato peritoneal de camundongo infectado por *Toxoplasma gondii*.
2. Calgranulina A liga-se à superfície de taquizoítas de *T. gondii*, provavelmente de forma não iônica.



## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- AMATO NETO, V. et al. Epidemiologia e transmissão. In: \_\_\_\_\_. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier, 1982. p. 15-26.
- APPLEFORD, P.J.; SMITH, J.E. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 65, p. 97-104, 1997.
- BARRAGAN, A. et al. The Duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. **Blood**, Washington, v. 95, n. 11, p. 3594-3599, June 2000.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, n. 12, p. 1625-1633, June 2002.
- BERTOLI, F. et al. A spectrum in the pathology of toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 119, p. 214-224, March 1995.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 607-623, September 2000.
- BLISS, S.K.; ZHANG, Y.; DENKERS, E.Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN- $\gamma$ -independent IL-12. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, p. 2081-2088, 1999.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1141-1145, March 1993.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1761-1767, May 1994.
- BONHOMME, A. et al. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 551-561, 1999.
- BOOTHROYD, J.C. et al. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 3-9, 1998.
- BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 438-442, 2002.
- BOTERO-KLEIVEN, S. et al. Receptor-mediated endocytosis in an apicomplexan parasite (*Toxoplasma gondii*). **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 98, p. 134-144, 2001.
- BRECHT, S. et al. The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 6, p. 4119-4127, February 2001.

- BUTCHER, B.A. et al. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148, n. 9, p. 2879-2886, May 1992.
- CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 73, p.114-123, June 1997.
- CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 421-428, 1999.
- CARRUTHERS, V.B.; GIDDINGS, O.K.; SIBLEY, L.D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.1, n. 3, p. 225-235, 1999.
- CARRUTHERS, V.B. et al. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 7, p. 4005-4011, July 2000.
- CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 81, p. 111-122, 2002.
- CHATTERTON, J.M.W. et al. *Toxoplasma gondii* *in vitro* culture for experimentation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 331-335, 2002.
- CLARK, D.L.; SU, S.; DAVIDSON, E.A. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. **Glycoconjugate Journal**, Boston, v.14, n. 4, p. 473-479, 1997.
- CLEARY, M.D. et al. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 1, n. 3, p. 329-340, June 2002.
- COOK, A.J.C. et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **British Medical Journal**, London, v. 321, n. 254, p. 142-147, July 2000.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 290, n. 20, p. 1110-1116, May 1974.
- DOBROWOLSKI, J.M.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, Cambridge, v. 84, p. 933-939, March 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**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 163-173, 1997.
- DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 33, p 637-668, 2001.

- DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1019-1024, 1998a.
- DUBEY, J.P. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. **Parasitology**, London, v. 116, p. 43-50, 1998b.
- 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**, Washington, v. 11, n. 2, p. 267-299, April 1998.
- DZIERZINSKI, F. et al. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 574-582, 2000.
- FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 355-359, August 2002.
- FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, p. 443-457. Junho 2002.
- FERRO, E.A. et al. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 8-9, p. 647-654, August 1999.
- FISCHER, H.-G.; BONIFAS, U.; REICHMANN, G. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 4826-4834, 2000.
- FOURMAUX, M.N. et al. *Toxoplasma gondii* microneme proteins: gene cloning and possible function. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 219, p. 55-58, 1996a.
- FOURMAUX, M.N. et al. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 83, p. 201-210, 1996b.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, Washington, v. 167, p. 893-896, February 1970.
- FROSCH, M. et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, New York, v. 43, n. 3, p. 628-637, March 2000.
- FURTADO, G.C.; CAO, Y.; JOINER, K.A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the  $\beta 1$  integrin receptor  $\alpha 6\beta 1$  on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 11, p. 4925-4931, November 1992.

- FURTADO, G.C. et al. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 6, p. 2337-2342, June 1992.
- GARCIA-RÉGUET, N. et al. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 353-364, 2000.
- GAZZINELLI, R.T. et al. Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 146, n. 1, p. 286-292, January 1991.
- GAZZINELLI, R.T. et al. Simultaneous depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 149, n. 1, p. 175-180, July 1992.
- GAZZINELLI, R.T. et al. Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon- $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 6115-6119, July 1993a.
- GAZZINELLI, R.T. et al. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- $\alpha$  and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 7, p. 3672-3681, October 1993b.
- GECZY, C. Regulation and proinflammatory properties of the chemotactic protein, CP-10. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1313, p. 246-252, 1996.
- GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, New York, v. 292, p. 162-168, 2002.
- GILBERT, R.E.; STANFORD, M.R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 84, p. 224-226, 2000.
- GROSS, U. et al. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 30-33, 1996.
- HEDDINI, A. et al. Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5849-5856, September 2001.
- HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 634-640, October 2002.
- HOLLAND, G.N. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 128, n. 4, p. 502-505, October 1999.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, p. 1561-1566, December 1995.

- HUNTER, C.A. et al. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2818-2824, July 1994.
- HUNTER, M.J.; CHAZIN, W.J. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 20, p. 12427-12435, May 1998.
- JACQUET, A. et al. The surface antigen SAG-3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 116, p. 35-44, 2001.
- JOHNSON, A.M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 13, n. 10, p. 393-397, 1997.
- JOHNSON, J. et al. Genetic analysis of influences on survival following *Toxoplasma gondii* infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 179-185, 2002.
- KERKHOFF, C.; KLEMPT, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1448, p. 200-211, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIN, Y.-L. et al. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 56, p. 93-96, 2002.
- LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 15, n. 2, p. 211-222, August 1992.
- MANGER, I.D.; HEHL, A.B.; BOOTHROYD, J.C. The surface of *Toxoplasma gondii* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2237-2244, May 1998.
- MARUYAMA, H. et al. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, n. 7, p. 3749-3754, April 2000.
- MEISSNER, M.; SCHLÜTER, D.; SOLDATI, D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. **Science**, Washington, v. 298, n. 5594, p. 837-840, October 2002.
- MENOZZI, F.D. et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 184, n. 3, p. 993-1001, September 1996.
- MINEO, J.R. et al. 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**, Baltimore, v. 150, n. 9, p. 3951-3964, May 1993.

- MINEO, J.R.; KASPER, L.H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 79, p. 11-20, 1994.
- MONTEIRO, V.G.; SOARES, C.P.; DE SOUZA, W. Host cell surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 164, p. 323-327, 1998.
- MORISAKI, J.H.; HEUSER, J.E.; SIBLEY, L.D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, p. 2457-2464, 1995.
- MORRISSETTE, N.S. et al. Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 79, p. 445-459, 1994.
- NACKEN, W. et al. S100A9/S100A8: myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 60, n. 6, p. 569-580, March 2003.
- NEVES, P.N. et al. **Parasitologia humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- NEWTON, R.A.; HOGG, N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the  $\beta_2$  integrin Mac-1 on neutrophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, p. 1427-1435, 1998.
- NEYER, L.E. et al. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 5, p. 1675-1682, May 1997.
- NICHOLS, B.A.; CHIAPPINO, M.L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Protozoology**, New York, v. 34, n. 2, p. 217-226, 1987.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoire nouveau du gondii – *Toxoplasma*. **Archives de L'Institute Pasteur de Tunis**, Tunis, v. 2, p. 43, 1909.
- 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**, Baltimore, v. 274, n. 3, p. 1267-1276, January 1999.
- PARVEEN, N. et al. Adaptation of the lyme disease spirochaete to the mammalian host environment results in enhanced glycosaminoglycan and host cell binding. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 1433-1444, 2003.
- PINZON-ORTIZ, C. et al. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for *Plasmodium* sporozoite attachment to target cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 29, p. 26784-26791, July 2001.
- REIS E SOUSA, C. et al. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin-12 by dendritic cells and their redistribution to T-cell areas. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 186, n. 11, p. 1819-1829, December 1997.
- REY, L. **Parasitologia**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

- ROBERTS, F.; McLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitology Today**, Amstersam, v. 15, n. 2, p. 51-57, 1999.
- ROBERTS, T.; MURRELL, K.D.; MARKS, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 10, n. 11, p. 419-423, 1994.
- ROBINSON, M.J. et al. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 5, p. 3658-3665, February 2002.
- ROULIN, K. et al. The fatty acid-binding heterocomplex FA-p34 formed by S100A8 and S100A9 is the major fatty acid carrier in neutrophils and translocates from the cytosol to the membrane upon stimulation. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 247, p. 410-421, 1999.
- RUIZ-BUSTOS, E. et al. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 50, n. 3, p. 215-222, March 2001.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M. et al. In the absence of endogenous IFN- $\gamma$ , mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, p. 4045-4054, 1996.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M. et al. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, n. 7, p. 1261-1273, April 1997.
- SCOTT, P.; HUNTER, C.A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, p. 466-470, April 2002.
- SHUKLA, D. et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell**, Cambridge, v. 99, p. 13-22, October 1999.
- SIBLEY, L.D.; HÅKANSSON, S.; CARRUTHERS, V.B. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. **Current Biology**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. R12-R14, 1998.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parásita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una mallattia che ricorda in molti punti il Kala-azar del l'uomo. **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.
- SRIKRISHNA, G. et al. Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, p. 4678-4688, 2001.
- SUZUKI, Y. et al. Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, Washington, v. 240, p. 516-518, April 1988.
- SUZUKI, Y. et al. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 5375-5382, 2000.



- SUZUKI, Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. **Journal of Infections Diseases**, Chicago, v. 186, suppl 2, p. S234-240, December 2002.
- TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- TOMAVO, S.; DUBREMETZ, J.-F.; SCHWARZ, R.T. A family of glycolipids from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 17, p. 11721-11728, June 1992.
- TRYBALA, E. et al. Glycosaminoglycan-binding ability is a feature of wild-type strains of herpes simplex virus type 1. **Virology**, New York, v. 302, p. 413-419, 2002.
- VELGE-ROUSSEL, F. et al. Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines. **Parasitology**, London, v. 123, p. 225-233, 2001.
- WAN, K.-L. et al. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 84, p. 203-214, 1997.
- WETZEL, D.M. et al. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 14, p. 396-406, February 2003.
- WIGHT, T.N.; HEINEGÅRD, D.K.; HASCALL, V.C. Proteoglycans: structure and function. In: HAY, E.D. (ed) **Cell biology of extracellular matrix**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1991. p. 45-78.
- ZHANG, J.P.; STEPHENS, R.S. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. **Cell**, Cambridge, v. 69, n. 5, p. 861-869, 1992.