

MON
576.311.34
R375
TES/ MEM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**Miosinas e iNOS em Macrófagos: Análise da Expressão e
Localização em Macrófagos Ativados e Durante Fagocitose de
*Toxoplasma gondii***

Danielle Silva Reis

Uberlândia-MG
2000

Miosinas e iNOS em Macrófagos: Análise da Expressão e Localização em Macrófagos Ativados e Durante Fagocitose de *Toxoplasma gondii*

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

SISBI/UFU



1000193776

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Grau de Mestre

Uberlândia-MG
2000

36347

FICHA CATALOGRÁFICA

R375m Reis, Danielle Silva, 1974-

Miosinas e iNOS em macrófagos : análise da expressão e localização em macrófagos ativados e durante fagocitose de *Toxoplasma gondii* / Danielle Silva Reis. - Uberlândia, 2000.

68f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

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

Bibliografia: f. 55 - 68.

1. Citoesqueleto - Teses. 2. Resposta imune - Teses. 3. *Toxoplasma gondii* - Teses. 4. Fagocitose - Teses. 5. Macrófagos - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. II. Título.

CDU: 576.311.348

DA/99 SISBI/UFU ex. 1
193776
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Biblioteca

FU-00011001-2

Agradecimentos:

- À Prof. Dra. Maria Aparecida de Souza, por sua dedicação e participação neste trabalho
- À Prof. Dra. Enilza Maria Espreafico e a todos do laboratório de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela atenção durante minha visita ao laboratório
- Ao meu orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela generosidade e espírito de equipe
- Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo pela contribuição técnica e intelectual
- Aos meus colegas de laboratório pela amizade e solidariedade
- Aos meus pais e familiares por todo o apoio que me deram
- Ao Marcos pelo carinho e companheirismo

Abreviaturas

ATP:	adenosina tri-fosfato
BCIP:	5-bromo, 4-cloro, 3-indoil fosfato
BSA:	soro albumina bovina
EDTA:	ácido etilenodiamino tetracético sal dissódico
EGTA:	ácido etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)
DMEM:	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DTT:	ditiotreitól
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
IL:	interleucina
INOS:	óxido nítrico sintase induzida
J774:	macrófagos tumorais murinos da linhagem J774
L1210:	células murinas leucêmicas
LPS:	lipopolissacarídeo
MCPI:	meio condicionado para produção de interferon
NBT:	ntiroblue tetrazolium
NEED:	dihidrocloridrato de naftiletilenodiamina
NK:	células “natural killer”
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintase
PBS:	salina tamponada em fosfato
SBF:	soro bovino fetal
SDS:	dodecil sulfato de sódio
TBS:	salina tamponada em tris
TGF-β:	fator de crescimento e transformação
Th1:	linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2:	linfócitos T auxiliares tipo2
TNF-α:	fator de necrose tumoral
TR:	“Texas Red”

Sumário

1 Introdução	1
2 Objetivos	10
3 Materiais e Métodos	11
3.1 Reagentes	11
3.2 Manutenção de <i>Toxoplasma gondii</i>	13
3.3 Cultivo de Macrófagos J774	13
3.4 Homogeneização de Células J774 e Separação de suas Proteínas para Detecção de Miosinas	14
3.5 Imunomarcação das Miosinas I, II, V, VI e IX nas Células J774	15
3.6 Cinética de Fagocitose	16
3.7 Tratamento de Macrófagos J774 para Produção de Óxido Nítrico (NO)	17
3.8 Dosagem de Óxido Nítrico	18
3.9 Detecção de Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) em Macrófagos J774	19
3.10 Fagocitose de <i>Toxoplasma gondii</i> por Células J774 Ativadas com IFN- γ ou com Mistura de MgCl ₂ e CaCl ₂	20
3.11 Invasão de Células J774 Ativadas com IFN- γ	20
3.12 Imunomarcação de Miosinas e β -tubulina em Células J774 após interação com <i>T. gondii</i>	21
3.13 Análise Estatística	22
4 Resultados	23
4.1 Identificação de Miosinas em Macrófagos J774	23
4.2 Análise Morfológica de Macrófagos J774 Durante Cinética de Fagocitose	24

4.3 Análise da Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos J774 Frente a Diferentes Tratamentos	27
4.3.1 Tratamento Simultâneo com LPS e IFN- γ	27
4.3.2 Tratamento com Cloreto de Magnésio ou de Cálcio em Comparação com IFN- γ	29
4.3.3 Tratamento com Citocalasina B	30
4.4 Avaliação do Efeito de IFN- γ e da mistura de Cloreto de Magnésio e Cloreto de Cálcio sobre o Espalhamento e Interação de <i>Toxoplasma gondii</i> com Macrófagos	32
4.4.1 Efeito de IFN- γ sobre o Espalhamento de Macrófagos em Cultura de 48 horas	32
4.4.2 Efeito de IFN- γ ou MgCl ₂ /CaCl ₂ sobre o Espalhamento de Macrófagos e a Fagocitose de <i>T. gondii</i>	33
4.4.3 Efeito de IFN- γ sobre a Fagocitose de <i>T. gondii</i> por Macrófagos	34
4.5 Avaliação do Efeito de Diferentes Tratamentos sobre a Expressão de iNOS e Miosinas em Macrófagos J774	35
4.6 Localização das Miosinas I e V em Macrófagos Ativados com MgCl ₂ / CaCl ₂	36
4.7 Localização das Miosinas I e V em Macrófagos Ativados com IFN- γ após interação com <i>T. gondii</i>	41
5. Discussão	43

6 Conclusões	50
7 Resumo	51
8 Summary	53
9 Referências Bibliográficas	55

1 Introdução

O conhecimento do mecanismo efetor na eliminação de parasitas intracelulares pelos macrófagos é tão importante quanto o conhecimento do mecanismo de escape destes parasitas da imunidade celular. Vários aspectos podem ser analisados durante a interação parasita-célula hospedeira. Entre eles podemos citar: transdução de sinais, interação com receptores específicos e resposta a estímulos ou a inibidores.

Os macrófagos são leucócitos mononucleados, altamente fagocíticos, que possuem ciclo de vida relativamente longo e adaptam suas respostas biosintéticas à presença de antígenos e a estímulos microbianos. Os macrófagos mantêm a homeostasia da vizinhança local e sistêmica, através de diversos receptores de membrana e da secreção de uma variedade de produtos, recebendo e gerando sinais que influenciam no crescimento, diferenciação e morte de outras células. Além disso, reconhecem e fagocitam células mortas por infecção ou apoptose, e microrganismos invasores, que são rapidamente eliminados do organismo (BLOCKER *et al.*, 1997). Na toxoplasmose, ou em outras infecções parasitárias, os macrófagos são importantes tanto no início da resposta protetora quanto no mecanismo efetor da imunidade contra seu agente (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). O contato de macrófagos com o parasita 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 agentes tóxicos, tais como reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio (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 Th

para linfócitos T de padrão Th1 (MILLER *et al.*, 1997; DENKERS & GAZZINELLI, 1998), para amplificação da resposta contra microrganismos invasores.

Geralmente, respostas Th1 são necessárias no controle de patógenos intracelulares como vírus, parasitas (*Leishmania major* e *T. gondii*) e bactérias (*Listeria monocytogenes*) (MILLER *et al.*, 1997). Esta resposta é regulada principalmente por citocinas de padrão Th2, como IL-10, que inibem principalmente a síntese de IFN- γ por células NK e linfócitos Th1 (DENKERS *et al.*, 1998,). Outras citocinas regulatórias são IL-4 e TGF- β , que potenciam o efeito de IL-10 sobre estas células (SKEEN *et al.*, 1996; DENKERS & GAZZINELLI, 1998) e IL-13, que inibe a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos (BOGDAN *et al.*, 1997).

A ativação dos macrófagos leva também a migração quimiotática e a fagocitose que são mediados pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Células danificadas ou em processo de morte sinalizam para macrófagos, que respondem aumentando a concentração de cálcio intracelular de forma ATP-dependente (OSHIMI *et al.*, 1999). O cálcio intracelular participa do movimento do citoplasma regulando a polimerização de actina e modificando a distribuição de microtúbulos. Entretanto o aumento de cálcio intracelular não interfere na redistribuição de miosinas (RICHELME *et al.*, 2000).

A internalização de componentes extracelulares pelos macrófagos ocorre por duas vias distintas: a endocitose (englobamento de pequenas partículas e partículas solúveis) e a fagocitose (englobamento de grandes partículas). A fagocitose ocorre em quatro etapas: o reconhecimento das células, que depende de receptores para a porção Fc de imunoglobulinas ou da interação específica de receptores dos fagócitos com moléculas do antígeno; a transdução de sinais, necessárias para mudanças na membrana ou no citoplasma e englobamento da partícula; a formação de um novo compartimento a partir da membrana citoplasmática, o fagossomo; e finalmente a fusão com lisossomos e acidificação necessários a

degradação da partícula internalizada (SIBLEY, 1995; BLOCKER *et al.*, 1997). A fagocitose tem como objetivo depurar parasitas invasores reconhecidos pela resposta imune bem como células mortas por infecções ou que sofreram apoptose (BLOCKER *et al.*, 1997) e processar e apresentar o antígeno para células T e B.

Uma característica importante dos leucócitos, crítica para a fagocitose, é a habilidade de mudar rapidamente de forma em resposta a ativação. Esta atividade depende da reorganização dinâmica do citoesqueleto (SMALL *et al.*, 1999). O citoesqueleto e proteínas motoras associadas estão envolvidos com várias atividades celulares, como fagocitose (CARON & HALL, 1998; SWANSON *et al.*, 1999), adesão celular (SUTER & FORSCHER, 1998), migração (STENDAHL *et al.*, 1980; ROCHLIN *et al.*, 1995; LEWIS & BRIDGMAN, 1996), transporte de organelas e vesículas (BLOCKER *et al.*, 1997; EVANS, HAMMER & BRIDGMAN, 1997) e transdução de sinais (HALL, 1998; WÜLFING & DAVIS, 1998).

O citoesqueleto é formado por uma rede tridimensional interligada de filamentos protéicos, responsável pela forma estável das células e pela organização e movimento do citoplasma. Existem três tipos diferentes de filamentos protéicos: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (FUCHS & CLEVELAND, 1998; HIROKAWA, 1998; MERMALL *et al.*, 1998). Os filamentos de actina são formados por moléculas de actina globular organizadas em hélice e uniformemente orientadas. São responsáveis não apenas pela manutenção da forma e polaridade das células, como também possuem propriedades dinâmicas necessárias ao movimento e divisão celulares (HALL, 1998). A polimerização de actina pode ser iniciada *in vitro* pela adição de sais como KCl a 0,1M ou $MgCl_2$ a 2mM (LIN *et al.*, 1980), sugerindo uma contribuição de $MgCl_2$ no espalhamento e fagocitose realizados por macrófagos. Os microtúbulos são estruturas formadas por 13 protofilamentos compostos por heterodímeros de α e β tubulina dispostos linearmente. Os

microtúbulos promovem um sistema direcionado para o deslocamento de proteínas, devido sua organização polarizada, com as extremidades “minus” localizadas no centrosomo (próximo ao núcleo) e as extremidades “plus” voltadas para a periferia da célula (GUNDERSEN & COOK, 1999). Os microtúbulos contribuem com o processo de fagocitose, por facilitar o transporte dos fagossomos (BLOCKER *et al.*, 1997). Os filamentos intermediários, ao contrário dos microtúbulos e filamentos de actina são formados por diferentes proteínas, específicas do tipo celular em que se encontram. Sua função está relacionada com a integridade estrutural e mecânica do citoplasma da célula (FUCHS & CLEVELAND, 1998).

Os filamentos de actina e os microtúbulos podem interligar-se em um sistema de cooperação entre suas proteínas motoras. Durante o transporte de organelas pode ocorrer a cooperação entre as proteínas motoras de actina (miosinas) e as proteínas motoras de microtúbulos (dineínas e cinesinas). Geralmente, as miosinas envolvidas no sistema de cooperação são as miosinas de classe V (BROWN, 1999). Estudos como o de ESPREAFICO *et al.* (1998) sobre a localização de miosina V em centrosomos mostra a associação desta proteína com regiões ricas em microtúbulos.

As miosinas são uma superfamília de proteínas motoras que se movem ao longo de filamentos de actina utilizando energia liberada pela hidrólise de ATP. As miosinas das células musculares são chamadas convencionais ou miosinas II e as demais são chamadas de miosinas não convencionais (MOOSEKER & CHENEY, 1995). As miosinas compreendem uma ampla família de proteínas com pelo menos 15 classes conhecidas de motores moleculares baseados em actina. Estas classes são divididas de acordo com a sequência de seus domínios motores, mas todas possuem uma estrutura comum: o domínio motor com sítios para ligação de actina e ATP unido ao domínio cauda por um domínio pescoço (MERMALL *et al.*, 1998). Miosinas de quatro diferentes classes foram identificadas em

macrófagos murinos: IC, II, V e IXb, cuja presença foi mostrada em fagossomos por imunofluorescência (SWANSON *et al.*, 1999). Além disso, existem várias evidências do envolvimento das miosinas com funções de motilidade celular (METHA *et al.*, 1999; TRYBUS *et al.*, 1999), fagocitose (SWANSON *et al.*, 1999) e transporte de vesículas (EVANS *et al.*, 1998).

A miosina II possui dois domínios cabeça que formam filamentos através da interação entre os domínios cauda anelados de diferentes moléculas. A miosina II está bem caracterizada como mediador da função contrátil de actina em células musculares e não musculares, mantendo a estrutura dos filamentos de actina (ROCHLIN *et al.*, 1995; MERMALL *et al.*, 1994).

A miosina I possui um único domínio cabeça conservado e um domínio cauda de tamanho variado (MERMALL *et al.*, 1998), com um sítio para ligação de actina e uma região básica que se liga a fosfolípidos ácidos de vesículas e da membrana plasmática (McGOLDRICK *et al.*, 1995), regulando a associação entre actina miosina e membrana plasmática durante a migração e fagocitose. A miosina I possui uma distribuição perinuclear e cortical dentro da célula (NOWAK *et al.*, 1997) e foi encontrada nos “cups” fagocíticos, principalmente nas regiões distais dos pseudópodes, sugerindo um importante papel na motilidade das estruturas membranosas e na formação do fagossomo (SWANSON *et al.*, 1999).

A miosina V é uma proteína dimérica, que possui um domínio motor com sítios para ligação de actina e ATP, um domínio pescoço com 6 motivos IQ para ligação de calmodulina e outras proteínas de cadeia leve (CHENEY *et al.*, 1993; LARSON, 1996; TRYBUS *et al.*, 1999) e um domínio cauda α -helicoidal dividido em um segmento inicial de 511 aminoácido e um domínio globular terminal de 410 aminoácidos (ESPREAFIGO *et al.*, 1992). A miosina V está envolvida no transporte de vesículas e organelas através dos

filamentos de actina em uma variedade de sistemas (NASCIMENTO *et al.*, 1997; EVANS *et al.*, 1998; MERMALL *et al.*, 1998; TABB *et al.*, 1998; LANGFORD, 1999; SUTER *et al.*, 2000). O papel da miosina V no transporte de vesículas é bastante estudado em genes mutantes para esta proteína. Mutações em miosina V murina resultam em uma série de deficiências em camundongos *dilute*, desde diluição da coloração do pelo, devido a um defeito no transporte de melanosomos de melanócitos para queratinócitos, até sintomas neuronais, que resultam em morte neonatal em três semanas (MERCER *et al.*, 1991). Em humanos a mutação no gene para miosina-Va resulta em uma doença autossômica recessiva, conhecida como doença de Griscelli e caracterizada por diluição da pigmentação e anormalidades imunológicas (PASTURAL *et al.*, 1997). A miosina V parece estar também envolvida com a transdução de sinais. COSTA *et al.* (1999) mostraram que a miosina V ativa CaM-Kinase II, uma proteína-quinase dependente de calmodulina.

A miosina VI possuem um domínio motor homólogo as outras miosinas e um domínio cauda em hélice altamente conservado. No domínio pescoço apresenta um único motivo IQ. Assim como as miosinas I e V, a miosina VI também está envolvida no movimento vesicular baseado em actina, movimento de membrana e endocitose (HASSON & MOOSEKER, 1994; MERMALL *et al.*, 1998). Uma recente descoberta de que a miosina VI se move em direção a extremidade menos do filamento de actina mostra uma particularidade da miosina VI em relação às outras miosinas, que se movem em direção a extremidade mais (WELLS *et al.*, 1999)

A participação do citoesqueleto na resposta dos macrófagos contra agentes invasores não está restrita ao transporte de organelas ou a emissão de pseudópodes. O citoesqueleto, tanto da actina quanto de microtúbulos estão integrados em um sistema que fornece estrutura para a interação entre os componentes das vias de sinalização dentro da célula (GUNDERSEN & COOK, 1999). A família Rho de GTPases é candidata como

agente de sinalização, pois está envolvida com a reorganização de filamentos de actina em resposta a estímulos extracelulares (CARON & HALL, 1998; SUTER & FORSCHER, 1998). Os microtúbulos contribuem com as vias de transdução de sinais, interagindo com quinases (MAPK e JUK) e com GTPases por diversos mecanismos (GUNDERSEN & COOK, 1999).

A atividade microbicida dos macrófagos é um evento dinâmico de transdução de sinais, que depende da interação com citocinas, para eliminação de agentes tóxicos e outras substâncias. NO é um agente microbicida, cuja liberação está diretamente relacionada com a ativação dos macrófagos. NO é derivado da transformação de L-arginina em citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas principais de NOS: a NOS neuronal e a NOS endotelial são constitutivamente expressas, a NOS induzida (iNOS) é regulada por mediadores inflamatórios (FRANDSEN *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1997). Tanto a NOS neuronal quanto a endotelial são reguladas pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina, ao contrário de iNOS, uma enzima Ca^{2+} -independente (CUNHA *et al.*, 1993; GREENBERG *et al.*, 1996; YUAN *et al.*, 1998), mas estudos recentes têm demonstrado que o bloqueio dos canais de cálcio regula a expressão de iNOS em macrófagos, sugerindo que Ca^{2+} é necessário para o aumento da expressão de iNOS (MUSTAFA & OLSON, 1999).

A expressão de iNOS é induzida por citocinas como IFN- γ , TNF- α ou produtos de parede bacteriana com LPS (GREENBERG *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1996) e inibida por quelantes de cálcio (PARK, 1995) e por citocalasina B, uma droga que despolimeriza filamentos de actina (FERNANDES *et al.*, 1996). Em estudos relacionando citoesqueleto e a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos (FERNANDES *et al.*, 1996) o tratamento com citocalasina B inibiu a produção de NO.

Toxoplasma gondii é um coccídeo intracelular pertencente ao filo Apicomplexa (DOBROWOLSKI *et al.*, 1997; DENKERS *et al.*, 1998), capaz de invadir e se replicar em qualquer célula nucleada (JOINER *et al.*, 1990; KASPER & MINEO, 1994; DOBROWOLSKI *et al.*, 1997; DENKERS *et al.*, 1998). 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. Uma vez ingeridos, os oocistos infectam as células epiteliais do intestino e se transformam em taquizoítas, que se multiplicam rapidamente por endodiogenia, dentro de vacúolos intracelulares. Quando as células infectadas se tornam repletas de taquizoítas, ocorre rompimento da membrana plasmática, liberação dos parasitas para o meio extracelular e infecção de novos tecidos (ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999). Os taquizoítas invadem as células hospedeiras por um processo ativo dependente do citoesqueleto de actina do parasita (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996).

O processo de invasão compreende uma série de eventos, nos quais estão envolvidas organelas especializadas que se localizam na porção anterior do *T. gondii*. A adesão do parasita na célula hospedeira é mediada por proteínas de superfície do parasita que se ligam a proteínas ou carboidratos presentes na membrana da célula. Logo após este contato, ocorre a protrusão do conóide do *T. gondii* e a secreção do conteúdo de micronemas e roptrias (ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999).

Grande parte da população mundial se encontra infectada por este parasita (DENKERS *et al.*, 1998; ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999), apesar disto, indivíduos imunocompetentes conseguem controlar a replicação do parasita. Geralmente, a infecção primária por toxoplasma em indivíduos imunocompetentes é assintomática (CHANNON & KASPER, 1996; ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999). Durante a

fase aguda da infecção, o sistema imunológico do hospedeiro não elimina o parasita, que dissemina para tecidos como músculo e cérebro. Com o desenvolvimento da imunidade, os parasitas se isolam do meio dentro de cistos, em uma forma latente e de multiplicação lenta, os bradizoítas (CHANNON & KASPER, 1996; DENKERS *et al.*, 1998).

Os bradizoítas permanecem no corpo do hospedeiro por toda a vida ou até que este se torne imunossuprimido. Recentes estudos têm demonstrado o efeito supressivo do tratamento de camundongos com anti-IFN- γ ou anti-TNF- α , que levam a conversão de bradizoítas em taquizoítas e à rápida replicação do parasita (SILVA *et al.*, 1998). Na verdade, duas formas da doença podem ser severas, a toxoplasmose adquirida congenitamente e a toxoplasmose adquirida por indivíduos imunocomprometidos (ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999).

Uma das características imunológicas mais marcantes da infecção por *T. gondii* é uma imunidade celular forte e persistente, resultando na proteção do hospedeiro contra o crescimento rápido dos taquizoítas (DENKERS *et al.*, 1998). Entretanto, *T. gondii*, entre outros organismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* possui mecanismos que inibem a fusão fagossomo-lisosomo (RABINOWITZ *et al.*, 1992). Após a invasão, ocorre a formação de um vacúolo resistente a fusão, chamado vacúolo parasitóforo formado por invaginação da membrana plasmática, porém sem rearranjo dos microfilamentos da célula hospedeira durante sua invasão pelo *T. gondii*. Ao contrário, durante a fagocitose ocorre com um extenso prolongamento da membrana e reorganização do citoesqueleto da célula hospedeira. O parasita é capturado em um fagossomo que rapidamente se funde com lisossomos, adquirindo pH ácido (SIBLEY, 1995).

Este trabalho relaciona a expressão de iNOS e de proteínas motoras com a ativação de macrófagos em resposta a diferentes tratamentos, e a distribuição destas proteínas em macrófagos nos processos de invasão e fagocitose do *Toxoplasma gondii*.

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal analisar a expressão e a localização das miosinas, particularmente das miosinas I e V, em macrófagos da linhagem J774, sob condições de ativação, durante fagocitose ou não do parasita *Toxoplasma gondii*. Para isso, atingimos os seguintes objetivos específicos:

Identificar por “Western blotting” miosinas das classes I, II, V, VI e IX em macrófagos J774.

Eleger uma substância ativadora para os macrófagos J774, através da quantificação da produção de óxido nítrico e da expressão de iNOS em macrófagos submetidos a tratamento com IFN- γ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , ionóforo de cálcio e citocalasina B.

Correlacionar, por “Western blotting”, a expressão de iNOS e das miosinas das classes I, II, V, VI em macrófagos submetidos a tratamento com IFN- γ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , ionóforo de cálcio e citocalasina B.

Investigar por imunofluorescência a localização de miosinas I e V em macrófagos em condições de controle ou de estímulo e durante interação com *T. gondii*.

3 Material e Métodos

3.1 Reagentes

Anticorpos:

- anticorpo policlonal de coelho anti-hemácias de carneiro (hemolisina)
- anticorpo policlonal de coelho anti-*T. gondii* (laboratório de Imunologia-UFU)
- anticorpo monoclonal de camundongo anti- β tubulina (Sigma)
- anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC)
- anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com FITC
- anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red (TR) (Amersham, Arlington Heights, IL)
- anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma)
- anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma)
- anticorpo monoclonal anti-iNOS de camundongo (Transduction Laboratories *A BD Company*, Lexington, KY).
- anticorpo anti-miosina IC humana (SKOWRON, BEMENT & MOOSEKER, 1998)
- anticorpo monoclonal anti-miosina IIb não muscular e anticorpo anti-cauda globular de miosina-V (fornecidos por M. MOOSEKER, Yale University)
- anticorpo anti-cabeça de miosina-V (SUTER *et al.*, 2000)
- anticorpo anti-cauda de miosina-V gerado contra proteína recombinante de miosina V (ESPREADICO *et al.*, 1992)
- anticorpo anti-miosina VI (HASSON & MOOSEKER, 1994)
- anticorpo anti-miosina IX humana (WIRTH *et al.*, 1996)

Corantes: Azul de Tripán (Sigma), Giemsa (Sigma) e Azul de bromofenol (Sigma).

Greiss: sulfanilamida (Sigma), dihidrocloridrato de naftiletlenodiamina (NEED) (sigma), ácido fosfórico H_3PO_4 (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e nitrito de sódio (NO_2^-) (Vetec).

Inibidores de protease: benzamidina (Sigma), aprotinina (Sigma), leupeptina (Sigma) e PMSF (Sigma).

Meio para cultura: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma).

Membranas: Nitrocelulose (Pharmacia Biotech, São Francisco, CA, EUA) e PVDF (Biorad, Lab., Inc., Hercules, CA).

Sais: Tris-base (Sigma), NaCl (Sigma), KCl (Vetec), Na_2HPO_4 (Sigma) e KH_2PO_4 (Sigma).

Soros: soro de cabra normal (SCN) (obtido no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia), soro albumina bovina (BSA) (Sigma).

Substrato para fosfatase alcalina: NBT/BCIP (Sigma).

Suplementos para DMEM: soro bovino fetal (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD), L-glutamina (Sigma), penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma).

Tampões: Hepes (Sigma), EDTA (Sigma), ATP (Sigma), DTT (Sigma), dodecilsulfato de sódio (SDS) (Labsynth Produtos para laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), β -mercaptoetanol (Sigma), EGTA (Sigma), sacarose (Sigma), metanol (Sigma), glicina (American Bioanalytical, Matlack, MA, EUA), Triton X-100 (Sigma), deoxicolato de sódio (Reagen Quimibras industrias S. A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Pipes (Sigma).

Tratamentos: Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* de sorotipo 055:B5 (Sigma), ionóforo de cálcio A23187 (Sigma), cloreto de magnésio e cloreto de cálcio [Sigma Chemical Company (St. Louis, MO,EUA)], citocalasina B (Sigma), IFN- γ (meio condicionado para produção de IFN- γ murino de células L1210).

3.2 Manutenção de *Toxoplasma gondii*

A manutenção de taquizoítas viáveis de *T. gondii* foi realizada por repique (passagem) do parasita em camundongos Swiss de 6 a 8 semanas. Os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 0,5 ml de suspensão da cepa RH do parasita viável. Após 48 horas, os animais foram mortos e injetados intraperitonealmente com salina tamponada em fosfato (PBS) estéril. A suspensão de taquizoítas obtida foi retirada e reinjetada em camundongos saudáveis.

3.3 Cultivo das Macrófagos J774

Macrófagos murinos J774 [American Tissue Culture Collection (Rockville, MD)] foram rapidamente descongelados em banho-maria a 37°C. Após adição de 10 ml de DMEM sem suplementos (DMEM-i), as células foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a

400 x g em centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento de células foi ressuspensão em 5 ml de DMEM suplementado (DMEM-c) com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado a 56°C, 2mM de L-glutamina, penicilina (100 mg/ml) e estreptomicina (100 U/ml) e transferido para garrafas de cultura de 25 cm² (Corning Glass Works, Corning, NY). As células foram então mantidas em estufa umidificada a 37°C contendo 5%CO₂, por cerca de 10 dias. Após um período de tempo suficiente para atingirem confluência, as células aderidas foram soltas com auxílio de pipeta, coletadas e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C. As células foram lavadas com DMEM-i e ressuspensas em DMEM-c. Um volume de 50 µl de Azul de Tripán foi adicionado a igual volume de suspensão destas células para contagem e determinação da viabilidade em câmara de Neubauer.

3.4 Homogeneização de Células J774 e Separação de suas Proteínas para Detecção de Miosinas

Suspensões de macrófagos J774 (1×10^7 células) em DMEM-i foram centrifugadas a 400 x g a 4°C por 10 minutos. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 300 µl de tampão H (25mM de HEPES pH 7,7, 5mM de EDTA, 5mM de ATP, 1mM de benzamidina, 0,1mM de aprotinina, 2µM de leupeptina, 0,5mM de PMSF e 2mM de DTT) com a microsonda OMNI-MIXER, mantendo-se as amostras em gelo. Aliquotas de 10 µl e 50 µl de cada amostra foram retiradas para dosagem protéica e análise em gel de poliacrilamida com gradiente de 5 a 22%, respectivamente. Após centrifugação a 40000 x g 4°C por 40 minutos, em centrífuga himac CR 21 (Hitachi Koki CO. Ltd., Takeda Hitachinake, Japan), foram obtidos um sedimento e um sobrenadante dos quais também

foram retiradas alíquotas de 10 µl e 50 µl para dosagem protéica e separação em gel. O cálculo do volume de proteína aplicado no gel foi feito de acordo com a concentração protéica, determinada pelo método de Bradford. As alíquotas foram misturadas na proporção de 10:1 em tampão de amostra (SDS a 8%, 30 mM de Tri-HCl, β-mercaptoetanol a 10%, 10 mM de EGTA, bromofenol a 0,06%, sacarose a 19%) e fervidas antes de carregar os géis com cerca de 10 µg de proteína por poço de acordo com LAEMMLI *et al.* (1970). O tempo de corrida variou 60 a 90 minutos em corrente constante de 30 mA em fonte Biorad.

3.5 Imunomarcação das Miosinas I, II, V, VI e IX nas Células J774

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para película de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade, embebidas em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e metanol a 20%). A transferência foi realizada em cuba de imersão para minigel (Biorad) a 100 mA por uma noite, para permitir transferência completa de proteínas de alto peso molecular (TOWBIN, STACHCLIN & GORDON, 1979). As tiras de nitrocelulose contendo as proteínas foram bloqueadas com salina tamponada com Tris (TBS)-Tween 0,05% por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação horizontal lenta. Após serem lavadas em TBS-Tween 0,05%, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em TBS-Tween 0,05% e incubados por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos anti-miosina IC, ou anti-miosina V (cabeça e cauda) ou anti-βtubulina, todos na diluição 1:1000, e anticorpos anti-miosina-VI (1:1500) e anticorpos anti-miosina II e anti-miosina IX (1:2000), sob agitação lenta. Após serem lavadas novamente em TBS-Tween 0,05%, foram adicionados conjugados imunoenzimáticos contra IgG de coelho para as miosinas e contra IgG de camundongo para a tubulina conjugados com fosfatase alcalina

e as membranas incubadas a temperatura ambiente por 2 horas sob agitação. A revelação da reatividade foi realizada com solução de NBT/BCIP. A reação foi interrompida após 5 a 30 minutos com ácido tricloro acético (TCA) a 2%.

3.6 Cinética de Fagocitose

Células obtidas como descrito no item 3.3 foram usadas para ensaio de fagocitose de hemácias de carneiro ou de taquizoítas de *T. gondii*. A papa de hemácias foi obtida por sangramento de um carneiro e os taquizoítas por lavagem peritoneal, com PBS, de camundongos Swiss infectados. Ambas amostras foram lavadas 3 vezes em PBS, antes da incubação de 30 minutos a 37° C com anticorpos (hemolisina a 105 µg/ml e anti-*T. gondii* de coelho a 360 µg/ml). Antes da opsonização, os taquizoítas foram ainda mortos por calor a 60°C por 30 minutos (BIGGS *et al.*, 1995). Uma suspensão de 5×10^5 macrófagos/ml em DMEM-i foi colocada para aderir por 20 minutos a 37° C em lâminas montadas com anéis de acrílico com capacidade para 100 µl. Após retirado o sobrenadante contendo células não aderidas, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e a eles foram adicionados PBS (controle), suspensões de hemácias a 1% (10 µl de papa pura de hemácias em 1000 µl de PBS) ou suspensões de 5×10^6 taquizoítas/ml (opsonizados ou não) e as lâminas foram incubadas por 15, 20, 30, 45, e 60 minutos a 37°C. Após o término de cada período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e coradas com Giemsa por 30 minutos, para análise em microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Tóquio, Japão).

3.7 Tratamento de Macrófagos J774 para Produção de Óxido Nítrico (NO)

Os macrófagos obtidos como descrito no item 3.3 foram transferidos para placas de 96 poços a uma concentração de 5×10^6 células/ml em 200 μ l de DMEM-c (CUNHA *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1998) e mantidas por 24 horas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultura de cada poço foi trocado por 200 μ l meio fresco contendo 5 μ g/ml de LPS; ou 5% de meio condicionado para produção de IFN- γ murino (MCPI) a partir de células L12L10 transformadas (5% MCPI); ou 2 mM de MgCl₂; ou 6 mM de CaCl₂; ou 10 μ M de citocalasina B; ou 5 μ M de ionóforo de cálcio (I-Ca); ou apenas DMEM-c (controle), como representado na tabela 1.

A co-estimulação também foi analisada, adicionado-se 5% de MCPI + 2 mM de MgCl₂; ou 5% de MCPI + 6 mM de CaCl₂; ou 5% de MCPI + 5 μ M de I-Ca; ou 5% de MCPI + 5 μ g/ml de LPS; ou 2mM de MgCl₂ + 6 mM de CaCl₂; ou 2mM de MgCl₂ + 5 μ M de I-Ca; ou 6mM de CaCl₂ + 5 μ M de I-Ca. Para tratamento inibitório, foi utilizada 10 μ M de citocalasina B juntamente com 5% de MCPI; ou 2mM de MgCl₂; ou 6mM de CaCl₂; ou 5 μ M de I-Ca (tabela 1).

A co-estimulação com IFN- γ foi realizada com mais um ou dois tratamentos: 5% de MCPI + 2 mM de MgCl₂ + 6 mM de CaCl₂; ou 5% de MCPI + 2 mM de MgCl₂ + 5 μ M de I-Ca; ou 5% de MCPI + 2 mM de MgCl₂ + 10 μ M de citocalasina B; ou 5% de MCPI + 6 mM de CaCl₂ + 5 μ M de I-Ca; ou 5% de MCPI + 6 mM de CaCl₂ + 10 μ M de citocalasina B; ou 5% de MCPI + 5 μ M de I-Ca + 10 μ M de citocalasina B (tabela 1). Duas placas foram, então, incubadas por 24 horas e 48 horas a 37°C/5% de CO₂, antes de serem coletadas aliquotas de 50 μ l de sobrenadante de cada poço para dosagem de NO ou detecção de iNOS. Cada tratamento foi realizado em duplicata.

Tabela 1: Tratamento de macrófagos murinos J774 para produção de NO

Estímulos	Coestimulação		Inibição + CitoB ^f +:
	Dupla	Tripla	
DMEM-c	IFN- γ^a + MgCl ₂ ^b	IFN- γ^a +:	DMEM-c
IFN- γ^a	IFN- γ^a + CaCl ₂ ^b		IFN- γ^a
MgCl ₂ ^b	IFN- γ^a + I-Ca ^d	MgCl ₂ ^b + CaCl ₂ ^c	MgCl ₂ ^b
CaCl ₂ ^c	IFN- γ^a + LPS ^e	MgCl ₂ ^b + I-Ca ^d	CaCl ₂ ^c
I-Ca ^d	MgCl ₂ ^b + CaCl ₂ ^c	CaCl ₂ ^c + I-Ca ^d	I-Ca ^d
LPS ^e	MgCl ₂ ^b + I-Ca ^d		IFN- γ^a + MgCl ₂ ^b
	CaCl ₂ ^c + I-Ca ^d		IFN- γ^a + CaCl ₂ ^b
			IFN- γ^a + I-Ca ^d

IFN- γ : interferon-gama; MgCl₂: cloreto de magnésio; CaCl₂: cloreto de cálcio; I-Ca: ionóforo de cálcio; LPS: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*; CitoB: citocalasina B; DMEM-c: meio DMEM completo; a: 5%; b: 2 mM; c: 6 mM; d: 5 μ M; e: 5 μ g/ml; f: 10 μ M.

3.8 Dosagem de NO

Alíquotas de 50 μ l dos sobrenadantes dos macrófagos J774 tratados como descrito no item 3.7 foram utilizadas para dosagem de NO pelo método de Greiss (PARK *et al.*, 1996; DERRICO & GOODRUM, 1996; LIU, YE & MALIK, 1997). Um volume de 50 μ l de cada amostra foi misturado a 50 μ l do reagente de Greiss em triplicata em placas de 96 poços de fundo redondo. O reagente de Greiss foi preparado misturando-se volumes iguais de uma solução de sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e uma solução de NEED a 0,1% em H₃PO₄ a 2,5%. O reagente foi ainda misturado com 50 μ l de DMEM-i (branco) ou 50 μ l de solução de nitrito em DMEM-i (curva). A curva teve como ponto inicial a concentração de 200 μ M e a partir deste ponto foi realizada uma diluição decrescente de ordem 2 até o ponto de 0,1903 μ M. A concentração de óxido nítrico de cada amostra foi determinada de acordo com a curva padrão, após leitura a 570 nm em fotocolorímetro Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories International SA, Lugano, Suíça).

3.9 Imunodeteccção de Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) e Miosinas I, II, V e VI em Macrófagos J774

Macrófagos murinos J774 (5×10^5 células/ml) foram cultivados em placas de fundo chato (96 poços) em DMEM-c por 24 horas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO_2 . Após este período o meio foi retirado e as células foram tratadas como descrito no item 3.7. As placas foram lavadas com PBS para eliminar o excesso de SBF. As células aderidas ao fundo dos poços foram, então, lisadas de acordo com SUJENA & POTASHNER (1998), com algumas modificações. Brevemente: após adição de 15 μl de tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,25% deoxicolato de sódio, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 1mM PMSF, pH 8,0) a cada poço, as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 1,5 ml (Eppendorf) e mantidas em gelo por 1 hora para lise completa. Uma aliquota de 5 μl de cada lisado foi diluída em 45 μl de água destilada para dosagem protéica pelo método de Bradford. O volume restante de homogeneizado foi misturado na proporção de 10:1 em tampão de amostra (SDS a 8%, 30 mM de Tri-HCl, β -mercaptoetanol a 10%, 10 mM de EGTA, bromofenol a 0,06%, sacarose a 19%). Após fervura por 2 minutos, 15 μg de proteína de cada amostra foram separadas em gel gradiente SDS-PAGE 5-22%. O tempo de corrida variou 60 a 90 minutos em corrente constante de 30 mA em fonte Bio-rad. Após transferência para membranas de nitrocelulose, as amostras foram imunomarcadas com anticorpo anti-iNOS de camundongo (Transduction) e reveladas por quimioluminescência.

3.10 Fagocitose de *Toxoplasma gondii* por Células J774 Ativadas com IFN- γ ou com mistura de MgCl₂ e CaCl₂

Aproximadamente 1×10^6 células/ml foram cultivadas em 200 μ l de DMEM-c sobre lamínulas de vidro 20 x 20 mm (Mezel Glasser, Alemanha), em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período o meio foi trocado por meio fresco contendo ou não 5% de IFN- γ ou 2mM de MgCl₂ + 6 mM de CaCl₂. As células assim tratadas foram incubadas por mais 48 horas nas mesmas condições. Após este período, foram adicionados 1×10^7 taquizoítas de *T. gondii*/ml em DMEM-c, mortos por calor de 60°C por 30 minutos (BIGGS, 1995) e opsonizados com anticorpos de coelho anti-*T. gondii* na diluição de 1:200 por 30 minutos a 37°C. A fagocitose foi permitida por 30 (ou 60) minutos a 37°C. As lamínulas foram lavadas com PBS 3 vezes antes de realizar a imunomarcação.

3.11 Invasão de Células J774 Ativadas com IFN- γ

Aproximadamente 1×10^6 células/ml foram cultivadas em 200 μ l de DMEM-c sobre lamínulas de vidro 20 x 20 mm (Mezel Glasser), em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período o meio foi trocado por meio fresco contendo ou não 5% de IFN- γ ou 2mM de MgCl₂ + 6 mM de CaCl₂. As células assim tratadas foram incubadas por mais 48 horas nas mesmas condições. Após este período, os macrófagos foram tratados com calor de 45°C por 15 minutos para inibição da fagocitose (NICHOLS & O'CONNOR, 1981). Foram adicionados 1×10^7 taquizoítas de *T. gondii*/ml em DMEM-c, viáveis e não

opsonizados. A invasão foi permitida por 60 minutos a 37°C. As lamínulas foram lavadas com PBS 3 vezes antes de realizar a imunomarcação.

3.12 Imunomarcação de Miosinas e β -tubulinas em células J774 após interação com *T. gondii*

As células obtidas como descrito nos itens 3.10 e 3.11 foram fixadas por 10 minutos em metanol gelado, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas por 20 minutos em tampão PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA, 3% sacarose, pH 7,0) contendo 0,1% Triton X-100 a temperatura ambiente. Após nova lavagem de 3 vezes de 5 minutos em PBS, as células foram incubadas com solução de bloqueio (5% soro de cabra normal e 2% soro albumina bovina (BSA) em PBS) por 1 hora a 37°C. As células foram lavadas novamente e incubadas com anticorpo monoclonal anti- β tubulina na diluição de 1:100, ou anticorpo de coelho anti-miosina I na concentração de 9,21 μ g/ml, ou anticorpo de coelho anti-miosina V (cabeça) na concentração de 5,52 μ g/ml em solução de bloqueio por 2 horas a 37°C. As células foram lavadas novamente e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com TR e anti-IgG de coelho conjugado com FITC por 30 minutos a 37°C. Em alguns experimentos o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo utilizado era conjugado com FITC. As lamínulas foram montadas em lâminas com solução protetora de fluorescência Prolong Antifade Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, EUA). As células foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus TH3 com objetiva 100 x e ocular 10 x, acoplado a câmera fotográfica (Olympus) ou em microscópio invertido Axiovert 100 (Zeiss), com objetiva 63 x 1,4 de abertura numérica, acoplado ao sistema de processamento de imagem Metamorph (Universal Imaging Corporation, West,

PA). As imagens foram também processadas no sistema Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Incorporated ©1989-1998, Mountain View, CA, EUA).

3.13 Análise Estatística

A análise dos dados para significância estatística foi realizada por análise de variância pelo teste de Bartlett, que faz uma comparação múltipla dos testes de Student, Newman e Keuls. O programa utilizado foi Graphpad Instat TM (Copyright © 1990-1993; Graphpad Software. V2.02). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. $P < 0,05$ foi aceito para diferenças estatísticas em todos os experimentos.

4 Resultados

4.1 Identificação de miosinas em Macrófagos J774

As proteínas separadas por eletroforese dos homogeneizados de macrófagos foram imunomarcadas por “Western blotting”. Houve imunoreatividade para as miosinas I, II, V, VI e IX, com sinal intenso das bandas, as quais foram únicas para cada miosina (Figura 1). A massa aparente das miosinas detectadas foi de 130 kDa para miosina I, 200 kDa para miosina II, 190 kDa para miosina V 145 kDa para miosina VI e 230 kDa para miosina IX. Estas bandas representam as cadeias pesadas destas miosinas separadas pela condição desnaturante da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol. Não houve degradação das bandas devido a utilização de tampão adequado para homogeneização das células, que foram utilizadas imediatamente após a coleta. A identificação destas miosinas na linhagem J774 de macrófagos possibilitou a análise destes motores em células ativadas ou não, através de sua expressão por “Western blotting” ou localização por imunofluorescência.

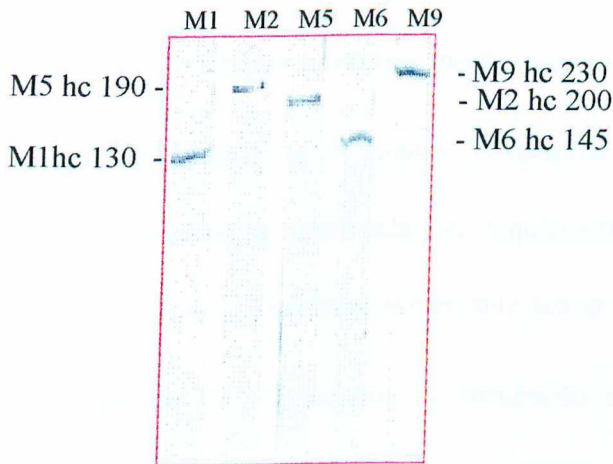


Figura 1: Determinação da presença de miosinas em homogeneizados de macrófagos murinos J774. Proteínas do sobrenadante de 1×10^7 macrófagos homogeneizados e centrifugados foram separadas por eletroforese. Após serem transferidas para membrana de nitrocelulose, as proteínas foram imunomarcadas com anticorpos policlonais de coelho anti-miosina IC (M1), anti-miosina V (M5), anti-miosina VI (M6) e anti-miosina IX (M9) e com anticorpos monoclonais anti-miosina II (M2).

4.2 Análise Morfológica de Macrófagos J774 durante Cinética de Fagocitose

Ensaio de cinética de fagocitose foram realizados, para definir o melhor período de incubação para a observação de estruturas relacionadas à fagocitose (fagossomo ou pseudópodes) e da distribuição de microtúbulos e de miosinas nos macrófagos. Após a incubação de células J774 com suspensões de taquizoítas de *T. gondii* na proporção de 1:10 ou com suspensões de hemácias a 1% por 15, 20, 30, 45 e 60 minutos a 37°C, as células foram lavadas em PBS e coradas com Giemsa para observação em microscópio óptico.

Na observação dos grupos controles (macrófagos em PBS), a maioria das células apresentou morfologia arredondada, com citoplasma escasso e o núcleo ocupando grande

parte da célula, indicando pouco espalhamento. Mesmo os controles dos intervalos de 45 e 60 minutos de incubação apresentaram morfologia semelhante (figura2a)

Tanto nos grupos de 15 quanto 20 minutos de incubação com eritrócitos ou *T. gondii*, foram observados eritrócitos ou taquizoítas apenas aderidos à membrana das células, cuja morfologia se manteve semelhante aos grupos controles (figura2b).

No intervalo de 30 minutos de incubação já podia ser notada a expansão do citoplasma, muitas vezes em direção aos eritrócitos ou taquizoítas aderidos. Neste intervalo de tempo foi contado o número de células com hemácias ou taquizoítas de *T. gondii* aderidos, assim como o número de eritrócitos ou taquizoítas por célula, após incubação de 30 minutos (Tabela 2). A adesão de hemácias aos macrófagos foi maior com a opsonização ($p < 0,001$). Ao contrário, a adesão de *Toxoplasma gondii*, que foi elevada em ambos os casos (opsonização ou não) e não houve diferença estatística entre os dois grupos ($p > 0,05$). No experimento de fagocitose de hemácias a maioria das células apresentaram apenas um eritrócito aderido ($p < 0,01$), enquanto que no experimento de fagocitose de *T. gondii* não foi observada diferença significativa entre o número de parasitas aderidos ($p > 0,05$).

Nos grupos de 45 e 60 minutos de incubação a maioria dos macrófagos apresentaram-se espalhados (figura2c). Grande parte das células estavam em fagocitose, tendo sido encontrada mais de uma célula dividindo o mesmo parasita (figura2d). Além disso, foi observada a união de alguns macrófagos para a formação de grandes vacúolos contendo grânulos, sugerindo degradação do conteúdo dos vacúolos.

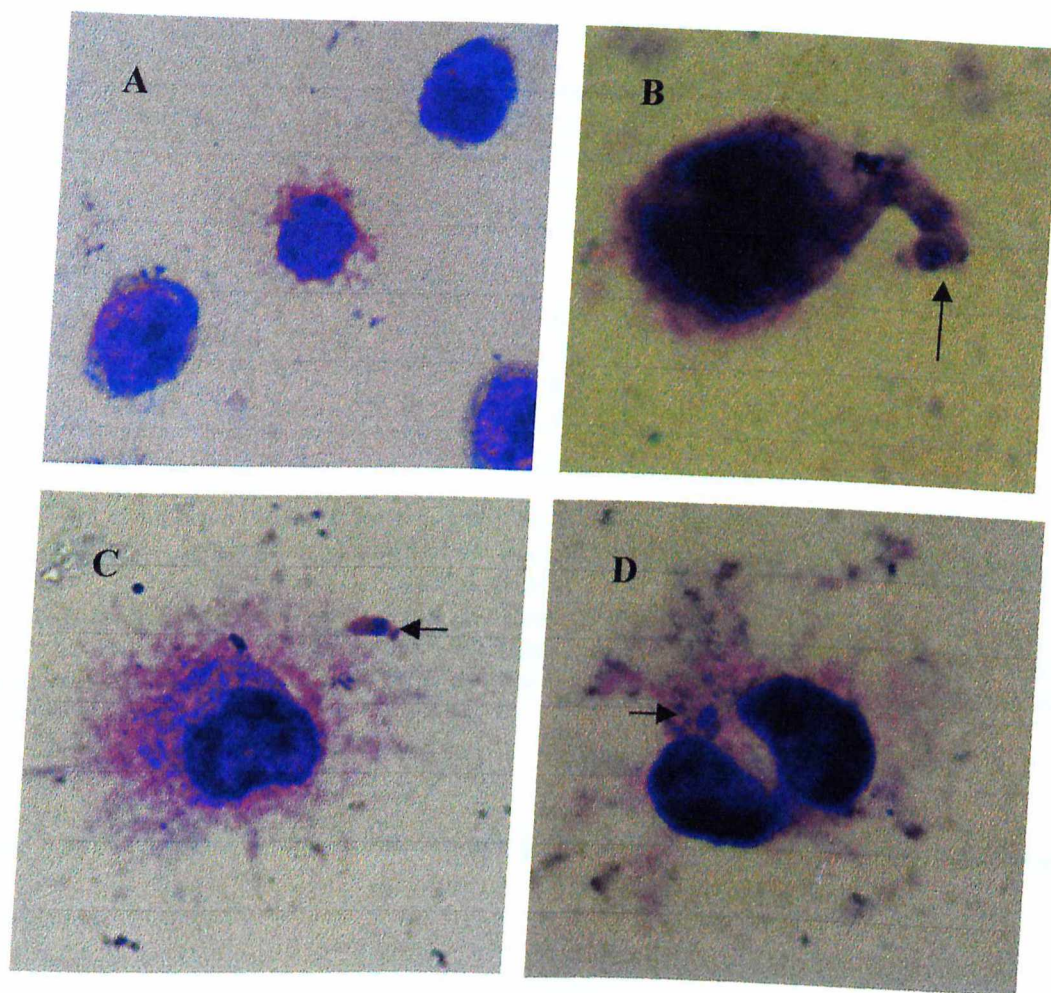


Figura 2: Análise morfológica de macrófagos J774 após fagocitose de *T. gondii*. Os macrófagos foram incubados com *T. gondii* por 15, 20, 30, 45 e 60 minutos em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂. As células foram lavadas e coradas com Giemsa para observação em microscópio óptico. A) Células representam macrófagos incubados por 15-60 minutos sem a presença de *T. gondii*. B) Células representam macrófagos incubados com *T. gondii* por 30 minutos. C) e D) Células representam macrófagos incubados com *T. gondii* por 45-60 minutos. As setas indicam o parasita.

Tabela 2: Adesão de eritrócitos de carneiro ou taquizoítas de *T. gondii* a macrófagos J774 após 30 minutos de incubação

		Porcentagem de Adesão (%)	
		sem opsonização	com opsonização
Eritrócitos/célula *	1	12,3 ± 2,1	28,7 ± 5,8
	2	3,3 ± 2,1	12,3 ± 3,8
	3	0,3 ± 0,5	3,6 ± 2,3
	> 3	1,0 ± 1,7	9,6 ± 5,9
	T	15,3 ± 2,3	55,0 ± 15,4
Taquizoítas/célula	1	21,0 ± 1,4	18,7 ± 4,6
	2	11,3 ± 1,7	5,8 ± 1,3
	3	5,8 ± 1,7	1,0 ± 0,0
	> 3	11,0 ± 1,4	2,5 ± 0,6
	T	49,0 ± 0,8	28,0 ± 5,6

(*) $p < 0,001$, diferença estatística entre os grupos com ou sem opsonização. Os valores representam a **Eritrócitos/célula**: número de eritrócitos aderidos em cada macrófago contado. Os valores representam a média de três grupos de 100 células mais o desvio padrão. **Taquizoítas/célula**: número de taquizoítas de *T. gondii* aderidos em cada macrófago contado. Os valores representam a média de quatro grupos de 100 células mais o desvio padrão. **1**: células com um antígeno aderido; **2**: células com dois antígenos aderidos; **3**: células com três antígenos aderidos; **> 3**: células com mais que três antígenos aderidos; **T**: total de células com antígenos aderidos.

4.3 Análise da Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos J774 Frente a Diferentes Tratamentos

4.3.1 Tratamento Simultâneo com LPS e IFN- γ

Para avaliar se macrófagos murinos J774 ativados simultaneamente com LPS e IFN- γ produziram níveis mais elevados de NO, estas células foram tratadas com DMEM-c (controle), com 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS ou 5% de MCPI juntos ou separados e o sobrenadante coletado para dosagem de NO pelo método de Greiss. Os macrófagos tratados com 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS produziram altos níveis de NO (11,01 μM), quando comparados com 3,12 μM de NO produzidos por macrófagos não tratados ($p < 0,05$). Macrófagos tratados apenas com IFN- γ produziram 21,44 μM de NO, um nível 7 vezes mais elevado do que o grupo

controle ($p < 0,001$) e 2 vezes mais que o grupo tratado com LPS ($p < 0,001$). Entretanto, LPS e IFN- γ adicionados juntos potenciaram a produção de NO por estas células (28,15 μM). A diferença de produção de NO entre os grupos tratados com IFN- γ e LPS + IFN- γ foi de 31,3% ($p < 0,05$). Os dados estão mostrados na figura 3.

Produção de NO
(μM)

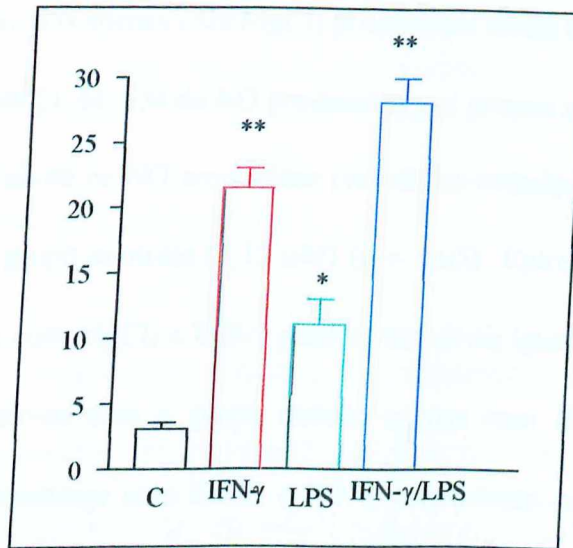


Figura 3: Efeito do tratamento simultâneo de macrófagos murinos J774 com LPS e IFN- γ . Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços em concentrações de 5×10^6 células/ml em 200 μl de DMEM-c por 24 horas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO_2 . Após este período, o meio de cultura de cada poço foi trocado por 200 μl de meio fresco contendo 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, ou 5% de MCPI, ou ambos, e as células foram incubadas por 48 horas a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Aliquotas de 50 μl dos sobrenadantes dos macrófagos assim tratados foram utilizadas para dosagem de NO pelo método de Greiss. Na dosagem de NO foram utilizadas triplicatas das alíquotas de cada tratamento, que foram realizados em duplicata ($n = 6$). As barras representam a média das dosagens das 6 amostras de um de três experimentos realizados em épocas diferentes. A concentração de óxido nítrico (em μM) foi determinada de acordo com a curva padrão, após leitura a 570 nm. C: controle; IFN- γ : 5% de MCPI; LPS: 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS; *) $p < 0,05$; **) $p < 0,001$.

4.3.2 Tratamento com Cloreto de Magnésio ou de Cálcio em Comparação com IFN- γ

Para avaliar o efeito dos cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} sobre a produção de NO, macrófagos murinos J774 foram tratadas por 48 horas com DMEM-c (controle), com 2mM de $MgCl_2$ ou 6 mM de $CaCl_2$, juntos ou separados, com ou sem 5% de MCPI. O sobrenadante foi coletado para dosagem de NO pelo método de Greiss (Tabela 2). Macrófagos tratados apenas com $MgCl_2$ produziram níveis baixos de NO (1,8 μM), quando comparados com 21,44 μM de NO produzidos por grupos tratados com IFN- γ ($p < 0,001$). Na verdade, os níveis de NO produzidos por células tratadas com $MgCl_2$ produziram níveis semelhantes ao grupo controle (3,12 μM) ($p > 0,05$). Entretanto, macrófagos estimulados simultaneamente com $MgCl_2$ e IFN- γ produziram níveis igualmente elevados de NO (20,16 μM), comparando-se com o grupo tratado apenas com IFN- γ ($p > 0,05$). Macrófagos tratados simultaneamente com $CaCl_2$ e IFN- γ produziram níveis elevados de NO (14,21 μM), porém não tão elevados quanto o grupo tratado apenas com IFN- γ ($p < 0,001$). Parece haver um efeito inibitório do cálcio sobre o tratamento de macrófagos J774 com IFN- γ , mas não do magnésio. O tratamento destas células apenas com $CaCl_2$, ou com $MgCl_2$ e $CaCl_2$ não ter influenciado a produção de NO, pois não houve diferença significativa destes grupos com relação ao grupo controle ($p > 0,05$). As células destes três grupos produziram em média 3,18 μM , 5,25 μM e 1,35 μM de NO, respectivamente. O tratamento simultâneo de IFN- γ com a mistura de $MgCl_2$ + $CaCl_2$ produziu maior aumento na produção de NO do que o tratamento simultâneo de IFN- γ com $MgCl_2$ ($p < 0,05$) ou com $CaCl_2$ ($p < 0,001$), porém não houve diferença estatística entre os grupos tratados apenas com IFN- γ e os grupos tratados com IFN- γ + $MgCl_2$ + $CaCl_2$ ($p < 0,05$).

Tabela 3: Efeito do tratamento concomitante de IFN- γ e sais de Magnésio e/ou Cálcio sobre a produção de NO por macrófagos J774

	Produção de NO (μ M)	
	sem IFN- γ (5%)*	com IFN- γ (5%) *
Controle ⁿ	3.12 \pm 0.37	21.44 \pm 1.41
MgCl ₂ (2uM) ⁿ	1.8 \pm 0.51	20.16 \pm 0.92
CaCl ₂ (6uM) ⁿ	3.18 \pm 0.45	14.21 \pm 3.96
MgCl ₂ (2uM) + CaCl ₂ (6uM) ⁿ	5.25 \pm 0.39	24.52 \pm 2.1

(*) $p < 0.001$. diferença estatística dos grupos com ou sem IFN- γ .

(n) número de amostras (n = 6 em todos os grupos)

4.3.3 Tratamento com Citocalasina B

A fim de avaliar o efeito inibitório da citocalasina B sobre a produção de NO por macrófagos J774, as células foram tratadas por 48 horas com DMEM-c (controle), ou com 5% de IFN- γ , ou com 2mM de MgCl₂, ou com 6 mM de CaCl₂, sozinhos ou simultaneamente, e ainda na presença ou ausência de citocalasina B. Após este período os sobrenadantes foram coletados para dosagem de NO pelo método de Greiss. Citocalasina B, quando adicionada simultaneamente com IFN- γ ou IFN- γ + MgCl₂ ou IFN- γ + CaCl₂, levou a uma diminuição significativa da produção de NO pelos macrófagos ($p < 0,001$). O efeito desta droga sobre a produção de NO nos outros grupos não apresentou diferença significativa (figura 4).

Produção de NO
(μM)

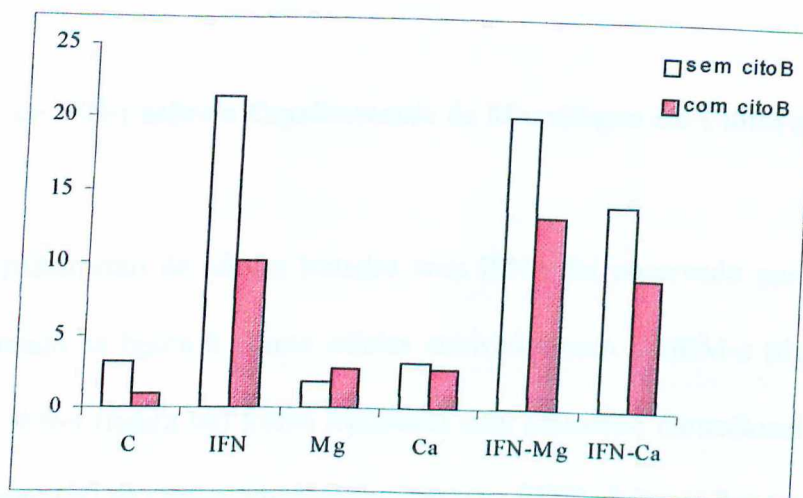


Figura 4: Influência da citocalasina B na produção de NO por macrófagos J774. Os macrófagos foram cultivados em 200 μl de DMEM-c por 24 horas a uma concentração de 5×10^6 células/ml em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO_2 e depois tratados com 5% de MCPI, ou 2 mM de MgCl_2 , ou 6 mM de CaCl_2 , simultaneamente ou não, e na presença ou ausência de 10 μM de citocalasina B. Aliquotas de 50 μl dos sobrenadantes dos macrófagos assim tratados foram utilizadas para dosagem de NO pelo método de Greiss. Na dosagem de NO foram utilizadas triplicatas das alíquotas de cada tratamento, que foram realizados em duplicata ($n = 6$). As colunas representam a média das dosagens das 6 amostras de um de três experimentos realizados em épocas diferentes. A concentração de óxido nítrico (em μM) foi determinada de acordo com a curva padrão, após leitura a 570 nm. C: controle; IFN: 5% de MCPI; Mg: 2 mM de MgCl_2 ; Ca: 6 mM de CaCl_2 ; IFN-Mg: 5% de MCPI + 2 mM de MgCl_2 ; IFN-Ca: 5% de MCPI + 6 mM de CaCl_2 .

4.4 Avaliação do Efeito de IFN- γ e da mistura de Cloreto de Magnésio e Cloreto de Cálcio sobre o Espalhamento e Interação de *T. gondii* com Macrófagos

4.4.1 Efeito de IFN- γ sobre o Espalhamento de Macrófagos em Cultura de 48 horas

O espalhamento de células tratadas com IFN- γ foi observado por fluorescência e está representado na figura 6. Tanto células cultivadas com DMEM-c (figura 6a) quanto com 5 % de IFN- γ (figura 6b) foram incubadas com anticorpo monoclonal anti- β tubulina, seguido por anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. A figura 8 mostra um grupo de células representativo do que foi observado nas lâminas analisadas. Na figura 6a estão quatro macrófagos de aspecto arredondado e um macrófago emitindo prolongamentos, com microtúbulos mais definidos. Na figura 6b a maioria dos macrófagos emitem prolongamentos, que se sobrepõem devido a proximidade das células.

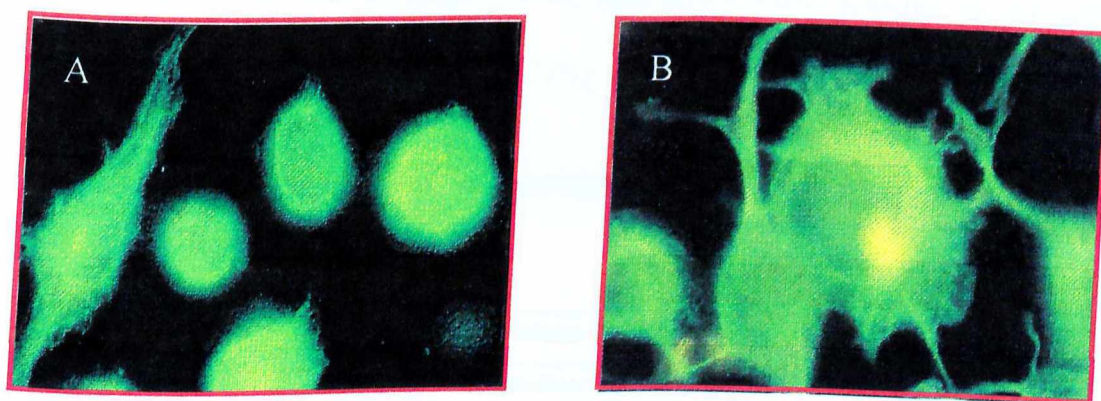


Figura 5: efeito de IFN- γ no espalhamento de macrófagos J774 após 48 horas de tratamento. Cerca de 5×10^5 células/ml foram cultivadas em lamínulas em DMEM-c por 24 horas a 37°C/5%CO₂ e tratadas com DMEM-c contendo 5% de MCPI por 48 horas. As células foram fixadas em metanol gelado por 10 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em tampão PHEM (60 mM de Pipes, 25 mM de Hepes, 5 mM de EGTA, sacarose a 3%, pH 7,0) e imunomarcadas com anticorpos de camundongo anti-tubulina e anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo/FITC. (A) representa macrófagos não tratados (pouco espalhamento). (B) representa macrófagos tratados com IFN- γ (muito ativados). As imagens foram obtidas através de análises em microscópio de fluorescência Olympus e sistema Adobe Photoshop 5.0 de análise de imagens.

4.4.2 Efeito de IFN- γ ou MgCl₂/CaCl₂ sobre o Espalhamento de Macrófagos e a Fagocitose de *T. gondii*

A fim de avaliar a influência do tratamento de macrófagos J774 sobre o espalhamento celular e a porcentagem de fagocitose e/ou invasão, 1×10^6 células/ml foram cultivadas por 48 horas com 5% de IFN- γ , ou 2mM de MgCl₂ + 6 mM de CaCl₂ ou DMEM-c (controle). Após incubação dos macrófagos com *T. gondii* por 1 hora, as células foram coradas e analisadas em microscópio óptico. A média e o desvio padrão da contagem de espalhamento das células J774 e fagocitose de *T. gondii* está representada na tabela 4. Houve aumento do número de células espalhadas nos grupos tratados (IFN- γ ou MgCl₂ + CaCl₂), quando comparados com grupo controle ($p < 0,001$). Com relação a fagocitose, não houve diferença significativa entre o grupo tratado com MgCl₂ + CaCl₂ e o grupo controle ($p > 0,05$), mas no grupo tratado com IFN- γ houve aumento da porcentagem de fagocitose, em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 4: Efeito do tratamento de macrófagos J774 sobre o espalhamento e fagocitose de *Toxoplasma gondii*.

Tratamento	Número de células J774 contadas nos diferentes processos (%)	
	Fagocitose (n)	Espalhamento(n)
DMEM-c	$9,2 \pm 3,0$	$39,0 \pm 9,0$
IFN- γ^a	$23,8 \pm 5,6 *$	$80,5 \pm 10,7 ***$
MgCl ₂ ^b + CaCl ₂ ^c	$15,8 \pm 5,4$	$79,5 \pm 12,9 ***$

IFN- γ : interferon-gama; MgCl₂: cloreto de magnésio; CaCl₂: cloreto de cálcio; a: 5%; b: 2 mM; c: 6 mM.

*) $p < 0,05$ (diferença dos tratamentos em relação ao controle); ***) $p < 0,001$ (diferença dos tratamentos em relação ao controle). (n) número de amostras ($n = 6$)

4.4.3 Efeito de IFN- γ sobre a Fagocitose de *T. gondii* por Macrófagos

Alguns macrófagos tratados com IFN- γ mostraram-se altamente ativados (como exemplificado na figura 7). Foi observada uma rede de microtúbulos bem definida, contornando espaços que, possivelmente, foram ocupados por fagossomos antes da extração. Esta figura ilustra o que foi observado sobre o número aumentado de células em fagocitose representado na tabela 4.

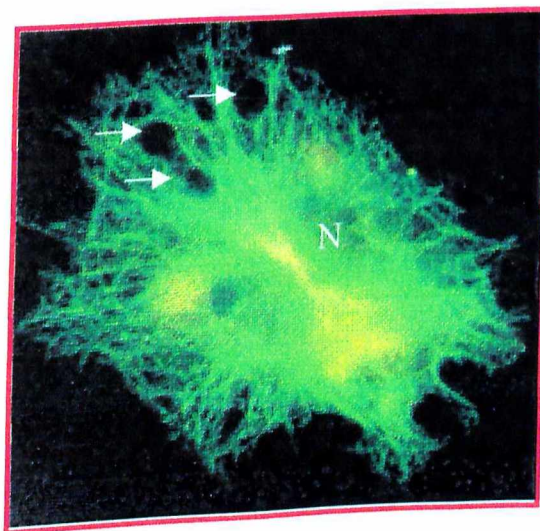


Figura 6: Macrófago murino J774 após 48 horas de estímulo com IFN- γ e 60 minutos de interação com *T. gondii*. 5×10^5 células/ml foram cultivadas em DMEM-c por 24 h a 37°C/5%CO₂. O meio foi então trocado por meio fresco ou contendo IFN- γ . Após um período de incubação de 48 horas, as células foram incubadas com taquizoítas mortos e opsonizados. Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas em metanol gelado por 10 minutos permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em tampão PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA, sacarose 3%, pH 7,0). Para a imunomarcação foram utilizados anti- β tubulina produzido em coelho como anticorpo primário e anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com FITC. N, região onde se encontra o núcleo. As setas indicam o espaço ocupado por fagossomos. As imagens foram obtidas de análises no microscópio de fluorescência Olympus e sistema Adobe Photoshop 5.0 de análise de imagens.

4.5 Avaliação do Efeito de Diferentes Tratamentos sobre a Expressão de iNOS e miosinas em Macrófagos J774

O aumento da produção de NO geralmente está relacionado com o aumento da expressão protéica de NOS em macrófagos. Para verificar se os macrófagos responderiam aos tratamentos citados no item 3.7 tanto a nível de expressão de iNOS como de produção de NO, foi realizado “Western blotting” de extrato de macrófagos segundo SUJENA & POTASHNER (1998) e as membranas marcadas com anticorpo monoclonal anti-iNOS (figura 7). A produção de NO acompanhou de modo geral a expressão de iNOS nos diferentes grupos. Todos os grupos contendo IFN- γ apresentaram maior produção de NO e expressão mais acentuada de iNOS. Esta observação foi verdadeira para ambos períodos de incubação, exceto para o grupo 2 de 48 horas e alguns grupos onde a expressão de iNOS não correspondeu com a produção de NO (grupos 9, 10, 16 e 18 durante 24 horas de incubação; grupos 3, 4, 9, 10 e 21 durante 48 horas de incubação). A expressão de iNOS também foi comparada com a expressão de algumas miosinas como miosinas I, II, V e VI (figura 8). Através de análise densitométrica pudemos notar que a quantidade de iNOS expressa foi maior nos grupos tratados com IFN- γ (66,8%), do que nos grupos tratados com ionóforo de cálcio ou citocalasina B (~2%). Bandas mais intensas de miosinas I, II, V e VI foram observadas nos grupos tratados com IFN- γ , entretanto, apenas a miosina V mostrou diferença de expressão entre os grupos controle e tratados com IFN- γ . A expressão da miosina V foi semelhante à de iNOS, sendo reduzida nas células controle (5%) comparando-se com as células tratadas com IFN- γ (61%). Tanto ionóforo de cálcio quanto citocalasina B tiveram um influência negativa sobre a expressão protéica para todas miosinas comparando-se com o controle.

4.6 Localização das Miosinas I e V em Macrófagos Ativados com $MgCl_2/CaCl_2$

Para estudar a distribuição das miosinas I e V em macrófagos J774 tratados ou não, as células foram incubadas com anticorpo de coelho anti-miosina V ou anti-miosina IC e anticorpo de camundongo anti- β tubulina e com anticorpos de cabra anti-IgG de coelho ou camundongo conjugados com FITC e analisadas em microscópio de fluorescência. Ambas miosinas apresentaram distribuição semelhante entre os grupos controle e tratado. A miosina V se distribuiu por todo o citoplasma, de maneira difusa (Figura 9), enquanto a miosina I ficou mais concentrada nas extremidades dos prolongamentos e no núcleo (Figura 10).

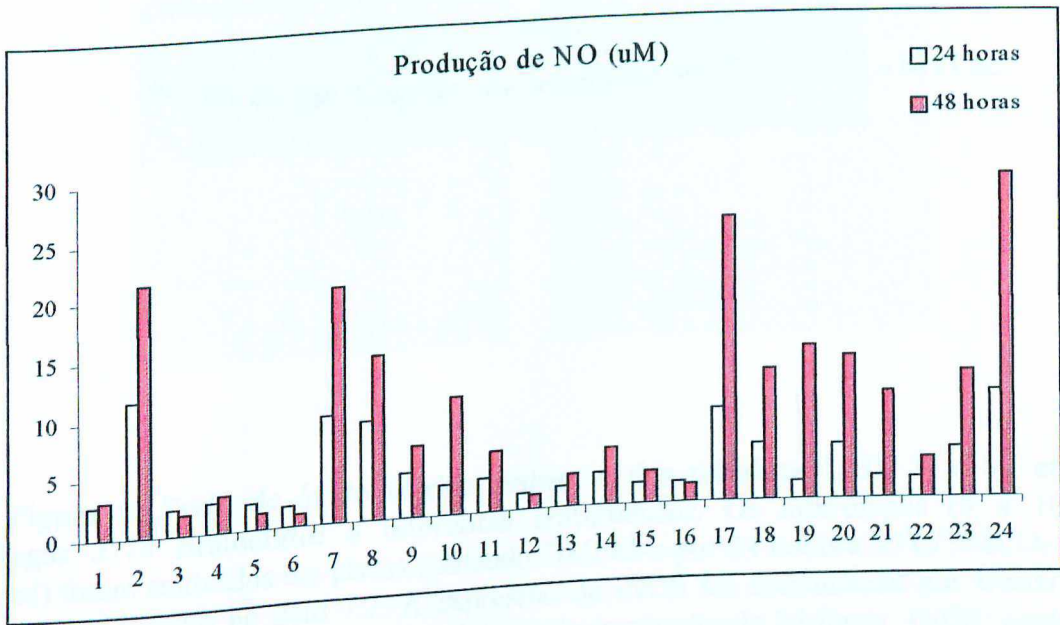
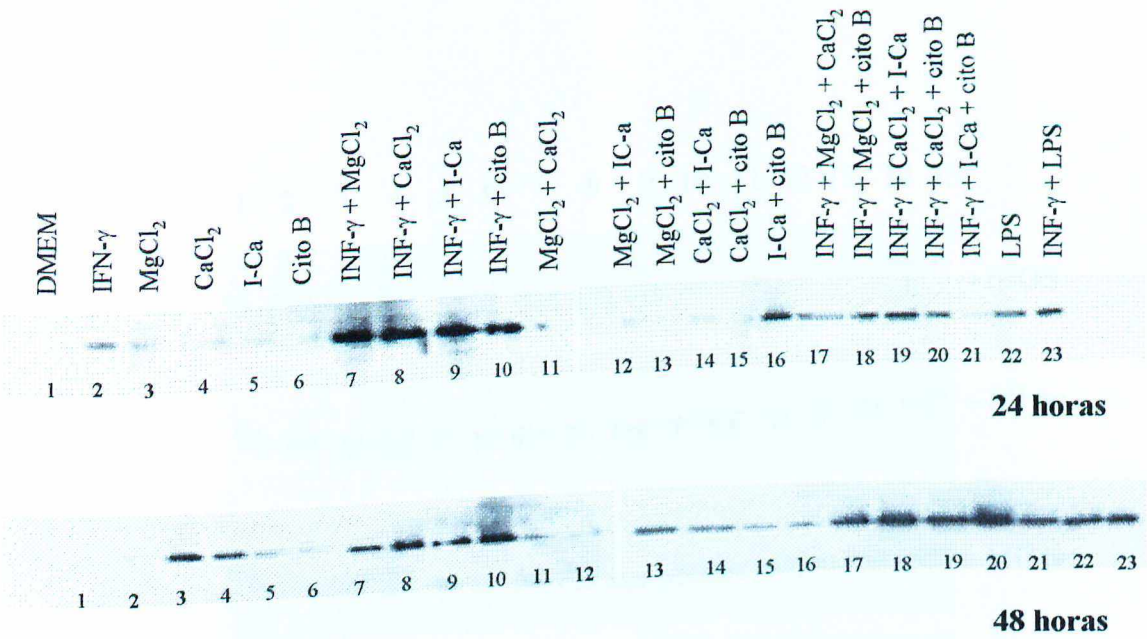


Figura 7: Comparação entre a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a produção de NO por macrófagos J774 após tratamento *in vitro*. Os macrófagos (5×10^5 células/ml) foram tratados como descrito no item 3.7. por 24 e 48 horas e o sobrenadante coletado para dosagem de NO pelo método de Greiss. A expressão de iNOS foi determinada por western blotting do lisado das monocamadas de células. O peso molecular aparente da enzima iNOS foi 130 kDa. Os tratamentos de 1 a 23 referentes à produção de NO correspondem ao imunoblot para iNOS.

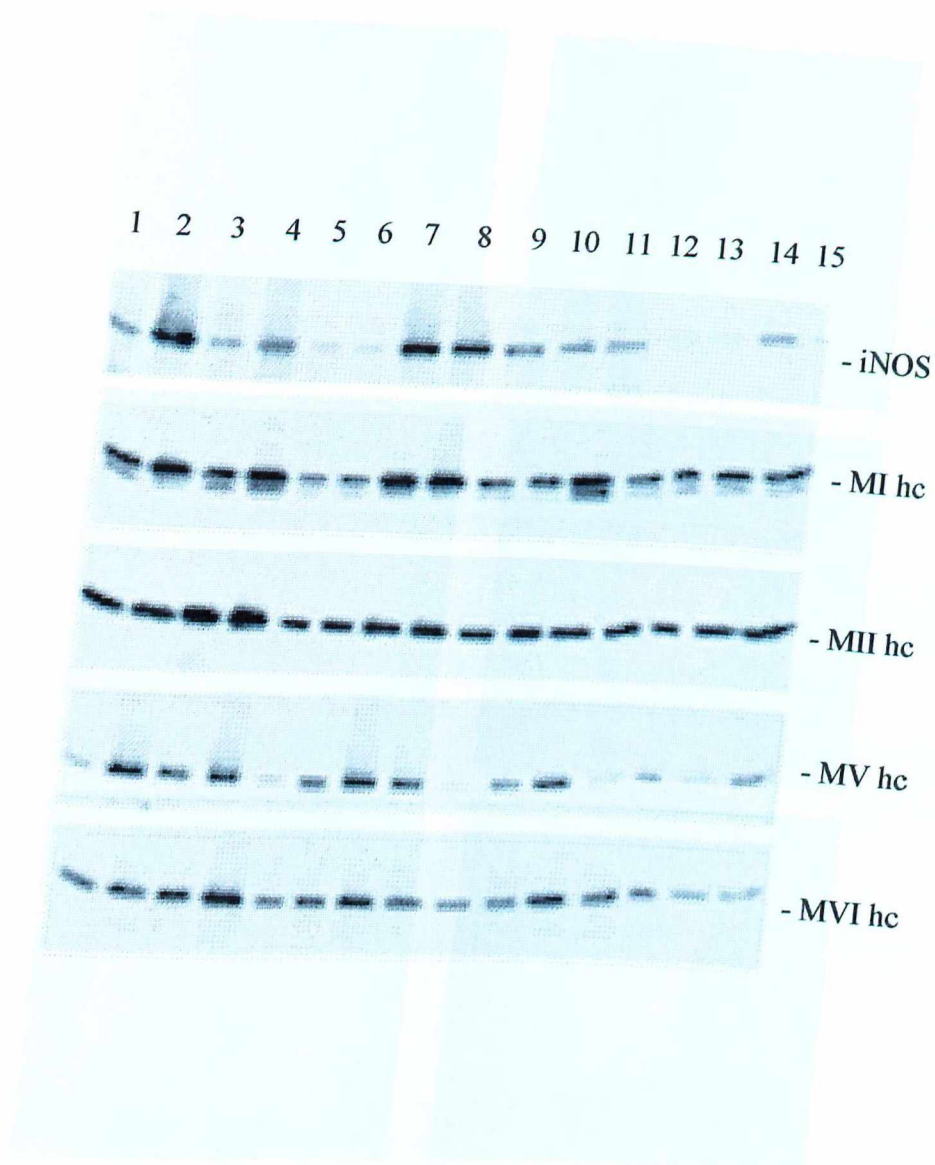


Figura 8: Perfil de óxido nítrico sintase e das miosinas I, II, V e VI em macrófagos J774 submetidos a diferentes tratamentos. Os macrófagos (5×10^5 células/ml) foram cultivados em placas contendo DMEM-c por 24 horas a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ e tratados como descrito no item 3.7. A expressão de iNOS foi determinada por western blotting do lisado das monocamadas de células após incubação de 24 horas. INOS: óxido nítrico sintase induzida, MIC hc: cadeia pesada de miosina IC, MII hc: cadeia pesada de miosina II, MV hc: cadeia pesada de miosina V, MVI hc: cadeia pesada de miosina VI. Os tratamentos de 1 a 15 correspondem a : DMEM, IFN- γ , MgCl_2 , CaCl_2 , ionóforo de cálcio, citocalasina B, IFN- γ / MgCl_2 , IFN- γ / CaCl_2 , IFN- γ /ionóforo de cálcio, IFN- γ /citocalasina B, MgCl_2 / CaCl_2 , MgCl_2 /ionóforo de cálcio, MgCl_2 /citocalasina B, CaCl_2 /ionóforo de cálcio e CaCl_2 /citocalasina B.

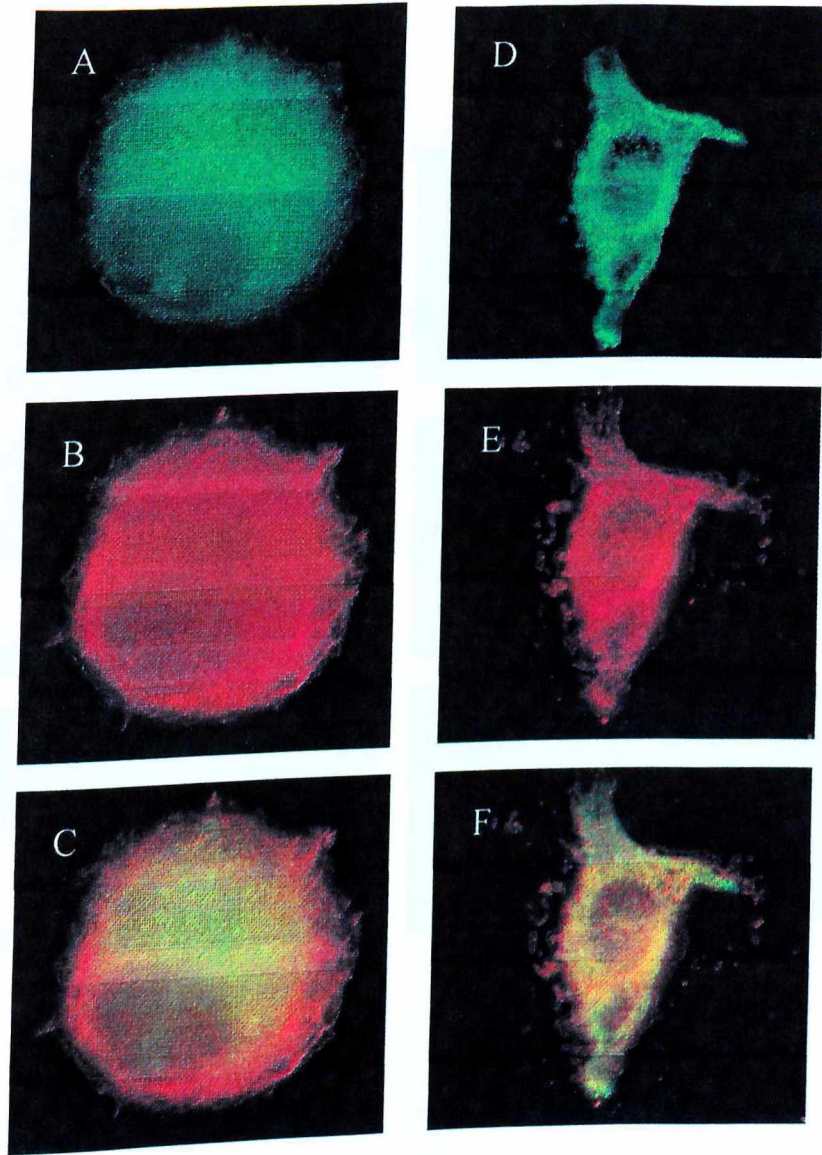


Figura 9: Localização de miosina V e β -tubulina em macrófagos J774 tratados ou não com magnésio e cálcio. Macrófagos foram cultivados por 48 horas em DMEM-c em estufa umidificada a 37°C/5%CO₂. Após este período, o grupo controle (A – C) foi incubado com DMEM-c e o grupo tratado (D – F) foi incubado com 2 mM de MgCl₂ + 6 mM de CaCl₂ por 48 horas. As células foram fixadas em metanol a 4°C por 10 minutos. A permeabilização foi realizada como descrito no item 3.12 e as células foram incubadas com anticorpo de coelho anti-miosina V (A e D) e anticorpo de camundongo anti- β tubulina (B e E) por 30 minutos a 37°C/5%CO₂. As células foram imunomarcadas com anticorpos de conjugado com Texas Red (vermelho). C) e F) mostram a colocalização (amarelo) de miosina V e β -tubulina. As imagens foram obtidas em microscópio invertido Axiovert acoplado aos sistemas de análise de imagens Metamorph e Adobe Photoshop 5.0.

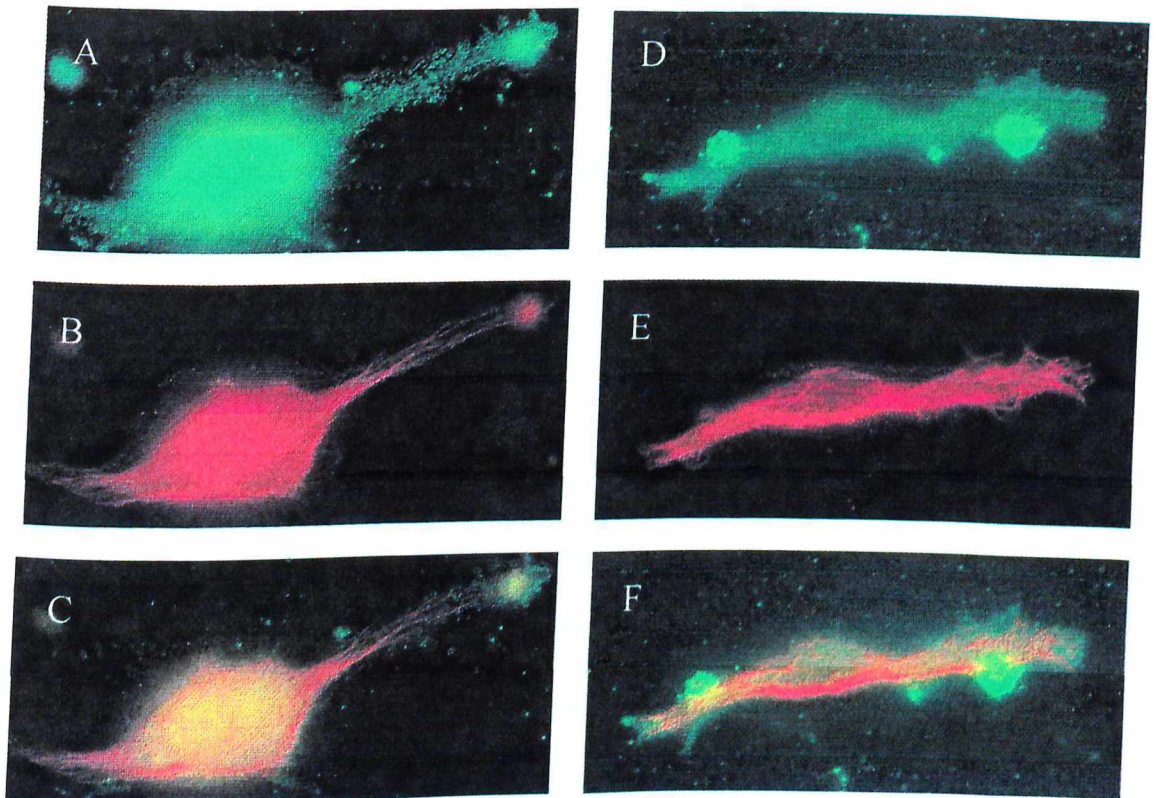


Figura 10: Localização de miosina I e β -tubulina em macrófagos J774 tratados ou não com magnésio e cálcio. Macrófagos foram cultivados por 48 horas em DMEM-c em estufa umidificada a $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Após este período, o grupo controle (A – C) foi incubado com DMEM-c e o grupo tratado (D – F) foi incubado com 2 mM de MgCl_2 + 6 mM de CaCl_2 por 48 horas. As células foram fixadas em metanol a 4°C por 10 minutos. A permeabilização foi realizada como descrito no item 3.12 e as células foram incubadas com anticorpo de coelho anti-miosina V (A e D) e anticorpo de camundongo anti- β tubulina (B e E) por 30 minutos a $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$. As células foram imunomarcadas com anticorpos de conjugado com FITC (verde) e anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red (vermelho). C) e F) mostram a colocalização (amarelo) de miosina IC e β -tubulina. As imagens foram obtidas em microscópio invertido Axiovert acoplado aos sistemas de análise de imagens Metamorph e Adobe Photoshop 5.0. As setas indicam regiões de maior concentração de miosina IC.

4.7 Localização das Miosinas I e V em Macrófagos Ativados com IFN- γ após interação com *T. gondii*

Para o estudo da localização das miosinas em macrófagos J774, comparando-se o dois processos de interação com *T. gondii*, células estimuladas por 48 horas com IFN- γ foram incubadas por 1 hora com o parasita. As figuras 11B e 11D mostram fagocitose de taquizoítas mortos pelo calor. As figuras 11A e 11C mostram a invasão de células em que a fagocitose foi inibida pelo calor. As quatro figuras mostram estruturas arredondadas e de tamanho sugestivos de fagossomos ou vacúolos parasitóforos. A miosina I apresentou marcação difusa, porém com maior intensidade sobre o núcleo e sobre o vacúolo parasitóforo durante a invasão (figura 11A), mas durante a fagocitose apresentou marcação localizada pontual em torno do fagossomo, sugerindo uma concentração de miosina nesta região (figura 11B). O mesmo pode ser observado em relação a miosina V (figuras 11C e 11D).

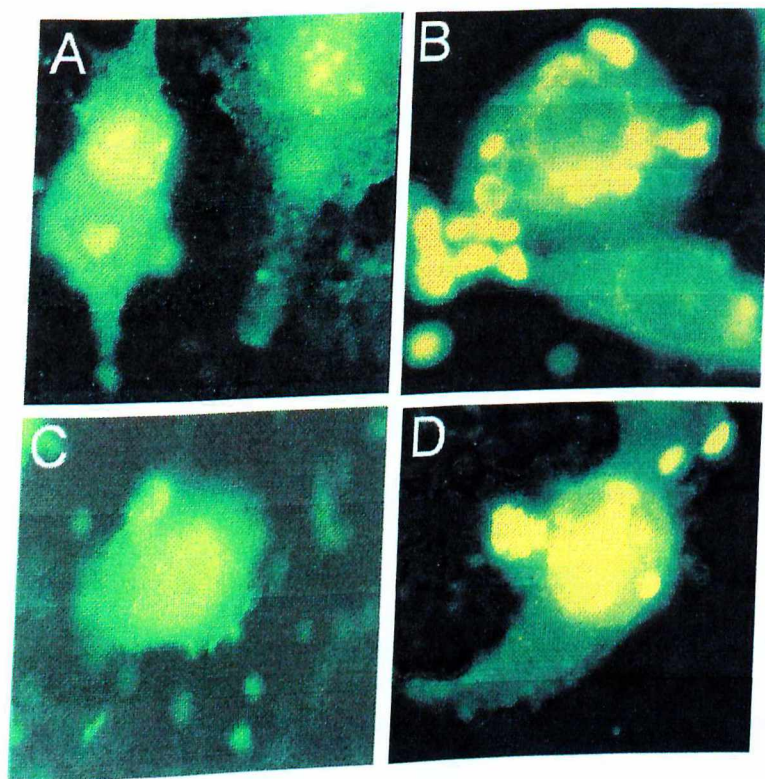


Figura 11: Distribuição de miosinas I e V durante interação de macrófagos J774 com *T. gondii*. As células foram cultivadas em lamínula de vidro em DMEM-c a 37°C/5%CO₂ por 48 horas. Após este período, foi permitida a interação entre as células J774 e *T. gondii* por 60 minutos a 37°C. Os macrófagos foram fixados em metanol a 4°C por 10 minutos, permeabilizadas em tampão (60 mM de Pipes, 25 mM de Hepes, 5 mM de EGTA, sacarose a 3%) contendo Triton-x 100 a 0,1% por 20 minutos a temperatura ambiente e incubados com anticorpos policlonais de coelho anti-miosina IC (A e B) e anti-miosina V (C e D) por 30 minutos a 37°C. A marcação foi realizada com anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com FITC. A e C) invasão. B e D) fagocitose. As imagens foram obtidas por análise em microscópio de fluorescência Olympus TH3 e processadas em sistema Adobe Photoshop.

5. Discussão

O macrófago representa uma importante linha de defesa na resposta primária contra microorganismos invasores, que são eliminados por fagocitose ou pela liberação de citocinas e de agentes tóxicos. Entretanto, patógenos intracelulares como *T. gondii* possuem mecanismos para escapar da imunidade celular em indivíduos imunossuprimidos (RABINOWITZ *et al.*, 1992; DENKERS *et al.*, 1998). O citoesqueleto dos macrófagos participa ativamente do processo de fagocitose, sendo as miosinas responsáveis por gerar a força motora necessária ao seu rearranjo, mas permanece passivo durante a invasão pelo *T. gondii*. Neste trabalho foi investigada a distribuição de proteínas motoras de macrófagos nas duas situações: células capazes de fagocitar ou células susceptíveis a invasão.

Antes de iniciar o estudo da localização de miosinas por imunofluorescência, foi determinada a presença das miosinas I, II, V, VI e IX por “Western blotting” em extratos de células J774. Este resultado está de acordo com SWANSON *et al.* (1999), que detectou a presença das miosinas I, II, V, IX em estudo com macrófagos murinos de medula óssea (MMMO). Estes autores utilizaram anticorpos contra as miosinas I, II, V, VI, VII e IX, embora não tenham observado a presença das miosinas VI e VII em MMO. A presença da miosina VI nos macrófagos J774 é sustentada por evidências de que esta miosina também está envolvida no movimento de vesículas e de membrana e na endocitose (HASSON & MOOSEKER, 1994; MERMALL, POST & MOOSEKER, 1998), funções essenciais para os macrófagos durante a fagocitose.

Para o estudo da distribuição do citoesqueleto e das miosinas nas células J774, foi necessário o uso de ativadores, que induzem o espalhamento de um grande número de células, permitindo a melhor visualização de estruturas como pseudópodes e vacúolos, formados após interação com *T. gondii*. Vários tratamentos (IFN- γ , MgCl₂, CaCl₂, ionóforo

de cálcio, citocalasina B e LPS) foram analisados através de dosagem de NO nestas células. NO é um potente microbicida e seu papel na defesa contra parasitas intracelulares está amplamente demonstrado (ADAMS *et al.*, 1990; DERRICO & GOODRUM, 1996; SHIBATA, METZGER & MYRVIK, 1997). Portanto, a quantidade de NO produzido reflete a ativação e capacidade de eliminação de *T. gondii* por estas células. Além disso, diferenças na intensidade da expressão de iNOS, também foram consideradas para análise destes tratamentos através de “Western blotting”. Foi detectada de uma proteína de massa molecular aparente de 130 kDa como já observado em estudos prévios (GREENBERG *et al.*, 1996).

Vários autores têm demonstrado o potente efeito de LPS e IFN- γ como ativadores de iNOS em macrófagos murinos (CUNHA *et al.*, 1993; EASON & MARTIN, 1995). Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram esta evidência, pois LPS e IFN- γ , quando adicionados simultaneamente às células em cultura, permitiram um aumento de cerca de 24% e de 61% em relação a IFN- γ ou LPS sozinhos, respectivamente, sobre a produção de NO pelos macrófagos J774. A coestimulação das células com IFN- γ , MgCl₂ e CaCl₂ também levou ao aumento da produção de NO em relação aos dois estímulos isoladamente. De fato, os íons Mg²⁺ e Ca²⁺ têm uma importante contribuição sobre o aspecto funcional dos macrófagos, seja por estimular a polimerização dos filamentos de actina, no caso do Mg²⁺ (LIN *et al.*, 1980), seja na regulação da expressão de iNOS, no caso do Ca²⁺ (MUSTAFA & OLSON, 1999). Entretanto, a expressão de iNOS depende, principalmente, de uma ativação específica que envolve a interação de moléculas antigênicas como LPS e citocinas como IFN- γ (EASON & MARTIN, 1995; GREENBERG *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 1996).

Células tratadas apenas com Ca²⁺ e/ou ionóforo de cálcio (abre canais de cálcio, possibilitando o aumento de Ca²⁺ intracelular) não produziram níveis mais elevados de NO

do que o grupo controle. Estes resultados possivelmente refletem um efeito tóxico do excesso de Ca^{2+} utilizado (6 mM), quando comparado com a quantidade de Ca^{2+} já existente no meio de cultura (1,8 mM). Apenas o grupo coestimulado com Ca^{2+} , IFN- γ e Mg^{2+} produziu altos níveis de NO, o que foi semelhante ao grupo tratado apenas com IFN- γ . Neste caso, o efeito tóxico de Ca^{2+} foi, possivelmente, diminuído pela adição de IFN- γ e Mg^{2+} devido ao aumento da atividade celular e consequentemente o aumento da eliminação de Ca^{2+} do citoplasma da célula.

O efeito inibitório da citocalasina B sobre a produção de NO já era esperado, pois este resultado foi também observado por FERNANDES *et al.* (1996). Estes autores demonstraram que a ruptura de microfilamentos por citocalasina B, em macrófagos murinos peritoneais, inibe a indução de iNOS em células previamente tratadas com LPS e IFN- γ . Isto pode ser explicado pelo fato de que o citoesqueleto participa também na transdução de sinais, tanto a nível de microtúbulos quanto de actina. Os microtúbulos fornecem a estrutura para unir os componentes das vias de sinalização e, possivelmente, aumentam sua eficiência de ativação (revisado por GUNDERSEN & COOK, 1999). Os filamentos de actina são regulados por Rho GTPases, proteínas que ligam os filamentos a receptores de membrana (HACKAM *et al.*, 1997; HALL, 1998) e estes dois sistemas de citoesqueleto estão integrados na participação do sistema de transdução de sinais.

O efeito de IFN- γ sobre o espalhamento dos macrófagos foi também analisado por imunofluorescência, para observar a distribuição do citoesqueleto antes da interação das células J774 com *T. gondii*. Nos grupos tratados com IFN- γ , a maioria das células estava ativada, pois os microtúbulos respondem às vias de sinalização (neste caso uma resposta ao IFN- γ para produção de NO) mudando sua dinâmica e organização, de modo a contribuir para o processo de transdução de sinais (GUNDERSEN & COOK, 1999).

O IFN- γ foi utilizado posteriormente nos ensaios de fagocitose e invasão, devido à sua alta capacidade de ativação, mesmo sozinho. O tratamento dos macrófagos com IFN- γ teve influência não apenas na produção de NO e no espalhamento celular, mas também na fagocitose de *T. gondii*. Estes resultados mostram que IFN- γ é importante na eliminação do parasita de duas formas: pelo aumento da liberação de agentes tóxicos, como relatado por SHIBATA *et al.* (1997), ou pela fagocitose, como relatado por BLOCKER *et al.* (1997).

Ao longo deste trabalho foram encontradas células altamente fagocíticas, após estimulação e incubação com o parasita. A observação da fagocitose de várias partículas, por uma mesma célula é um fato comum. SWANSON *et al.* (1999) observaram não só a fagocitose de vários eritrócitos agregados, como também duas células dividindo o mesmo eritrócito. Isto também foi observado durante nosso trabalho, demonstrando a alta capacidade fagocítica da linhagem J774 de macrófagos. Nesta mesma linhagem celular foi observado o centro organizador de microtúbulos (centrosomo), como observado por ESPREAFICO *et al.* (1998) em estudo da localização de miosina V no centrosomo de células MDCK, onde mostraram a colocalização de miosina V com esta região rica em microtúbulos. A marcação de tubulina no centrosomo nos macrófagos J774 pode ser útil em estudos de localização futuros, que abordem outros aspectos como colocalização com miosinas ou estudos de divisão celular.

A fim de comparar a expressão de iNOS e a expressão das miosinas frente aos diferentes tratamentos, foram realizados ensaios de “Western blotting” com anticorpos dirigidos contra iNOS, MI, MII, MV e MVI. A expressão de iNOS foi menor nos grupos em que foi adicionado ionóforo de cálcio ao tratamento, ao contrário dos grupos em que foi adicionado IFN- γ .

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos durante dosagem de NO, mostrando o efeito destes tratamentos, tanto a nível de expressão protéica quanto da liberação de seu

produto, e sugerem que o IFN- γ sozinho ou com outros tratamentos induzem a produção de NO. Entretanto CUNHA *et al.* (1993), estudando a produção de NO em macrófagos J774 obtiveram resultados diferentes. Estes autores sugerem o tratamento destas células com IFN- γ sozinho leva a produção de baixos níveis de NO e que estes níveis aumentam com o efeito sinérgico de IFN- γ e LPS. Mesmo assim, os valores de NO encontrados são relevantes para a realização deste trabalho, já que a quantidade de NO produzida no grupo tratado apenas com IFN- γ foi maior que no grupo controle e o mesmo ocorreu com a expressão da enzima iNOS. Além disso, o objetivo do tratamento com IFN- γ , que foi conseguir a expansão do citoplasma da maioria das células, foi alcançado. Com relação às miosinas, estas apresentaram uma variação de expressão semelhante à iNOS, frente aos diferentes tratamentos. Podemos destacar a miosina V, que está relacionada com o transporte de organelas e vesículas. Sua expressão aumentada em células tratadas com IFN- γ sugere que esta citocina contribui para o aumento da produção de miosina V em células ativadas.

Após o ensaio de cinética de fagocitose, foram determinados períodos de 30 e 60 minutos de incubação das células com os parasitas, onde ocorreram as observações mais importantes. A maioria das células, altamente ativadas, apresentavam taquizoítas ou hemácias aderidos à membrana, podendo ser observadas muitas características sugestivas de fagocitose, como vacúolos e pseudópodes. O mesmo período foi utilizado para ensaios de invasão, levando-se em conta alguns estudos anteriores, como os de ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD (1999) e de SHAW & TILNEY (1999).

Em análise da influência da opsonização sobre a fagocitose, foi considerada a porcentagem de adesão. A adesão de hemácias aos macrófagos foi maior com a opsonização, sugerindo que a fagocitose foi dependente do estímulo de receptores Fc

(SWANSON *et al.*, 1999). Entretanto a adesão de *T. gondii* foi semelhante em ambos grupos, contrariando os achados de BIGGS *et al.* (1995), que demonstraram o aumento da fagocitose por macrófagos com a opsonização de taquizoítas mortos pelo calor. Este resultado pode ser sustentado por evidências de que a adesão do *T. gondii* ocorra por outras vias, que envolvem a interação específica de moléculas do parasita como laminina, lectinas ou SAG-1 (p-30) com receptores da célula hospedeira (KASPER & MINEO, 1994; ORTEGA-BARRIA & BOOTHROYD, 1999). Durante a fagocitose não foram observadas estruturas como os “cups” fagocíticos como observado por SWANSON *et al.* (1999). Para ter a chance de encontrar tais estruturas, teria sido necessário o uso de técnicas de vídeo microscopia (SWANSON *et al.*, 1999), que permite a captura da imagem de determinada estrutura em diferentes momentos de sua formação. Um outro recurso seria o método de pulso de infecção, como realizado por MORDUE & SIBLEY (1997), que permite analisar um grande número de células contendo fagossomos no mesmo estado de maturação.

Nos estudos de imunofluorescência, após fagocitose de *T. gondii*, as miosinas I e V se localizaram, principalmente nas regiões distais dos pseudópodes e em torno dos fagossomos, sugerindo seu importante papel na motilidade das estruturas membranosas e na formação e transporte do fagossomo, como demonstrado por SWANSON *et al.* (1999). O mesmo não foi observado em relação a invasão, confirmando a ausência de participação do citoesqueleto e proteínas motoras da célula hospedeira no processo de invasão como relatado por SIBLEY (1995). A localização de miosina I nas extremidades de pseudópodes, sugerem seu importante papel no espalhamento desta linhagem celular. Além disso a alta concentração desta miosina em locais da células que parecem o início da emissão dos prolongamentos, possivelmente devido a seu recrutamento para estas regiões de intensa atividade motora.

O presente trabalho abordou a participação das miosinas de macrófagos J774 em atividades motoras necessárias à célula durante sua interação com *T. gondii*. Neste sentido, pode-se mostrar uma presença mais marcante das miosinas I e V nos fagossomos formados durante a fagocitose do que nos vacúolos parasitóforos. Desta forma, estes resultados fornecem evidências que contribuirão para o entendimento da complexa participação do citoesqueleto e proteínas associadas no mecanismo de defesa destas células contra *T. gondii*.

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

A linhagem murina J774 de macrófagos contém várias miosinas, sendo importante ferramenta para o estudo dos motores moleculares em processos como a fagocitose.

IFN- γ , sozinho ou em coestimulação, é um potente ativador de macrófagos murinos J774.

A expressão de iNOS neste tipo celular reflete na produção de NO

A mistura $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ contribui para o espalhamento de macrófagos murinos J774.

Citocalasina B inibe a expressão de iNOS e a produção de NO por macrófagos J774

Novos estudos serão necessários para uma análise mais direcionada ao aspecto funcional das miosinas no processo de fagocitose por macrófagos J774.

7 Resumo

O processo de fagocitose, realizado por macrófagos e outras células fagocíticas, é importante na destruição de vários agentes estranhos ao organismo. Entretanto, alguns patógenos intracelulares, como *Toxoplasma gondii*, são capazes de penetrar ativamente a célula hospedeira e inibir a fusão fagossomo-lisossomo. Além disso, durante a invasão de macrófagos pelo *T. gondii* não há extensão da membrana ou rearranjo dos microfilamentos da célula hospedeira. Ao contrário do processo de fagocitose do parasita morto, opsonizado ou não por anticorpos, o processo de invasão depende do citoesqueleto de actina do parasita e não da célula hospedeira. Vários estudos têm demonstrado o envolvimento do citoesqueleto e proteínas motoras em processos importantes para a célula, tais como, migração, fagocitose, transporte de vesículas e transdução de sinais. A miosina I parece estar envolvida nos processos de migração e fagocitose. A miosina V parece estar envolvida no movimento de vesículas através dos filamentos de actina e se distribui por todo o citoplasma e córtex celular. A miosina VI também parece estar envolvida no movimento vesicular e de membranas. Enquanto que a miosina II parece estar relacionada com a manutenção do citoesqueleto de actina durante a emissão de pseudópodes. O presente trabalho tem por objetivo analisar a resposta de macrófagos J774 a estímulos *in vitro* e/ou à interação com *T. gondii*, bem como a distribuição de miosinas nas células J774 em duas situações: fagocitose ou invasão. Para isso foram determinadas a produção de óxido nítrico (NO) por dosagem em sobrenadante de células em cultura, a expressão protéica de óxido nítrico sintase (NOS) e das miosinas I, II, V e VI por “Western blotting” e a localização das miosinas I e V por imunofluorescência. A expressão das miosinas I, V e VI foi coincidente com a expressão de iNOS nos diferentes tratamentos sofridos por estas células. IFN- γ aumentou a produção de NO pelas células J774 tanto sozinho como em

coestimulação. Além disso IFN- γ aumentou o número de células espalhadas após 48 horas de tratamento e a porcentagem de adesão de *T. gondii* aos macrófagos. As miosinas I e V se distribuíram principalmente nos pseudópodes e em torno dos fagossomos formados durante a fagocitose. Entretanto, ambas miosinas tiveram marcação difusa durante a invasão dos macrófagos pelo *T. gondii*. Os resultados sugerem que IFN- γ é uma potente ativador de macrófagos J774 e que as miosinas I e V participam do processo fagocítico do parasita morto.

8 Summary

Phagocytosis is a process developed by macrophages and other phagocytes that are important in the destruction of many foreign agents. Although, some intracellular pathogens, like *Toxoplasma gondii*, are able to actively get into host cell and inhibit the fusion of phagosomes and lysosomes. In addition, during *T. gondii* invasion of macrophages there is no extensions of the membrane, or actin cytoskeleton rearrangement in host cell. In contrast with phagocytosis of dead parasite, opsonized or not, invasion by *T. gondii* depends on the actin cytoskeleton of the parasite, but not of host cell. Many studies have shown the involvement of cytoskeleton and myosins in important events for host cell, such as migration, phagocytosis, vesicle traffic, and signal transduction. Myosin I is found to be involved in migration and phagocytosis events and is concentrated on perinuclear region and cortex. Myosin V is found to be involved in vesicle movement on actin filaments and is distributed all over the cytoplasm and cortex region. The aim of this work is analyze the response of J774 macrophages to stimuli *in vitro* and/or to interaction with *T. gondii*, through the determination of the production of nitric oxide (NO) by dosage in supernatants of cultured cells, through the protein expression of nitric oxide synthase (NOS) and the myosins I, II, V and VI by Western blotting, and through observation of the distribution of myosins I and V by immunofluorescence. The murine macrophage J774 presented myosins I, V and VI, which expression were coincident with iNOS expression in the different treatments on these cells. IFN- γ increased the production of NO by J774 cells, alone or by costimulation. In addition, IFN- γ increased the amount of spreaded cells after 48 hour of treatment and increased the percentage of adhesion of *T. gondii* on macrophage membrane. Myosins I e V localized, mainly on pseudopodia and phagosomes formed during phagocytosis. Although, both myosins were diffused labeled during invasion of

macrophages by *T. gondii*. Results suggest that IFN- γ is a potent activator of macrophages J774 and that myosins I and V participate on phagocytosis of dead parasite.

9 Referências Bibliográficas

- ADAMS, L.B., HIBBS, J. B., TAINTOR, R. R. & KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 2, p. 2725-2729, 1990.
- BIGGS, B. A., HEWISH, M., KENT, S., et al. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 6132-6139, 1995.
- BOGDAN, C., THÜRING, H., DLASKA, M., RÖLLINGHOFF, M. & GÜNTER Mechanism of supression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. **The Journal of Immunology**, v. 159, p. 4506-4513, 1997.
- BLOCKER, A., SEVERIN, F. F., BURKHARDT, J. K., BINGHAM, J. B., YU, H., OLIVO, J. C., SCHROER, T. A., HYMAN, A. A. & GRIFFITHS, G. Molecular requirements for bi-diretional movement of phagosomes along microtubules. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 1, p. 113-129, 1997.
- BROWN, S. S. Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. **Annual Review in Cell Development Biology**, v. 15, p. 63-80, 1999.

- CARON, E. & HALL, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science**, v. 282, p. 1717-1721, 1998.
- CHANNON, J. Y. & KASPER, L. H. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 64, n.4, p. 1181-1189, 1996.
- CHENEY, R. E., O'SHEA, M. K., HEUSER, J. E., COELHO, M.V., WOLENSKI, J. S., ESPREAFICO, E. M., FORSCHER, P., LARSON, R.E. & MOOSEKER, M. S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell**, v. 75, p. 13-23, 1993.
- COSTA, M. C., MANI, F., SANTORO, W. Jr., ESPREAFICO, M. E. & LARSON, R. E. Brain myosin-V, a calmodulin -carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15811-15819, 1999.
- CUNHA, F. Q., ASSREUY, J., MONCADA, S. & LIEW, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide syntase in murine macrophages. **Immunology**, v. 79, n. 3, p. 408-411, 1993.

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

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, n. 4, 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, p. 933-939, 1996.

EASON, S. & MARTIN, W. Involvement of tyrosine kinase and protein kinase C in the induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharide and interferon-gamma in J774 macrophages. **Archives of International Pharmacodynamic Ther.**, v. 330, n.2, p.225-240, 1995.

- ESPREADICO, E. M., CHENEY, R. E., MATTEOLI, M. NASCIMENTO, A. A. C., CAMILLI, P. V., LARSON, R. E. & MOOSEKER, M. S. Primary Structure and Cellular Localization of Chicken Brain Myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. **The Journal of Cell Biology**, v.119, n.6, p. 1541-1557, 1992.
- ESPREADICO, E. M., COLING, D. E., TSAKRAKLIDES, V., KROGH, K., WOLENSKI, J. S., KALINEC, G. & KACHAR, B. Localization of myosin-V in the centrosome. **Proceedings in National Academy of Science USA**, v. 95, p. 8636-8641, 1998.
- EVANS, L. L., HAMMER, J. & BRIDGMAN, P. C. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from *dilute-lethal* neurons. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 439-449, 1997.
- EVANS, L. L., LEE, A. G., BRIDGMAN, P. C. & MOOSEKER, M. S. Vesicle-associated brain myosin can be activated to catalyze actin-based transport. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 2055-2066, 1998.
- FERNANDES, P. D., ARAUJO, H. M., RIVEROS-MORENO, V. & ASSREUY, J. Depolymerization of macrophages microfilaments prevents induction and inhibits activity of nitric oxide synthase. **European Journal of Cell Biology**, v. 71, n. 4, p. 56-62, 1996.

- FRANDSEN, U., LOPES-FIGUEROA, M. & HELLSTEN, Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 227, n. 1, p. 88-93, 1996.
- FUCHS, E. & CLEVELAND, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science**, v.279, p. 514-519, 1998.
- GREENBERG, S. S., XIE, J., ZHAO, X., JIE, O. & GILES, T. D. An *in vivo* cytokine and endotoxin-independent pathway for induction of nitric oxide synthase II m RNA, enzyme, and nitrate/nitrite in alveolar macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 227, n. 1, p. 160-167, 1996.
- GUDERSEN, G. G. & COOK, T. A. Microtubules and Signal Transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 81-94, 1999.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, p.509-514, 1998.
- HACKAM, D. J., ROTSTEIN, O. D., SCHREIBER, A., ZHANG, W. & GRINSTEIN, S. Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc γ receptors in macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n. 6, p. 955-966, 1997.
- HASSON, T. & MOOSEKER, M. S. Porcine myosin-VI: Characterization of a new mammalian unconventional myosin. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 2, p.425-440, 1994.

- HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v.279, p. 519-526, 1998.
- 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.
- KANTAKAMALAKUL, W., POLITIS, A. D., MAREEKI, S., SULLIVAN, T., OZATO, K., FENTON, M. J. & VOGEL, S. N. Regulation of IFN consensus sequence binding protein expression in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 12, p. 7417-7425, 1999.
- KASPER, L. H. & MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184-187, 1994.
- KIM, H. M.; LEE, E. H. SHIN, T. K., CHUNG, C. K. & NA, N. H. Inhibition of the induction of the inducible nitric oxide synthase in murine brain microglial cells by salicylate. **Immunology**, v.95, p. 389-394, 1998.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANGFORD, G. M. ER transport on actin filaments in squid giant axon: implications for signal transduction at synapse. **FASEB Journal**, Dec. 13 suppl 2, S248-50, 1999.

- LARSON, R.E. Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 309-318, 1996.
- LEWIS, A. K. & BRIDGMAN, P. C. Mammalian myosin I α is concentrated near the plasma membrane in nerve growth cones. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 33, p. 130-150, 1996.
- LIN, D. C., TOBIN, K. D., GRUMET, M. & LIN, S. Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. **The Journal of Cell Biology**, v. 84, p. 455-460, 1980.
- LIU, S. F., YE, X. & MALIK, A. B. In vivo inhibition of nuclear factor-kB activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. **The Journal of Immunology**, v.159, n.8, p. 3976-3983, 1997.
- McGOLDRICK, C. A., GRUVER, C. & MAY, G. S. *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. **The Journal of Cell Biology**, v.128, n.4, p.577-587, 1995.
- MEHTA, A. D., ROCK, R. S., RIEF, M., SPUDICH, J. A., MOOSEKER, M. S. & CHENEY, R.E. Myosin-V is a processive actin-based motor. **Nature**, v.400, p.590-593, 1999.

- MERCER, J. A., SEPERACK, P. K., STROBEL, M. C., COPELAND, N. G. & JENKINS, N. A. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, v. 349, p. 709-713, 1991. Erratum: *Nature*, v. 352, p. 547, 1991.
- MERMALL, V., McNALLY, J. G. & MILLER, K. G. Transport of cytoplasmic particles by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature*, v. 369, p. 560-562, 1994.
- MERMALL, V., POST, P. L. & MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, v. 279, p. 527-533, 1998.
- 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.
- MOOSEKER, M. S. & CHENEY, R. E. Unconventional myosins. *Annual Review in Cell Developmental Biology*, v. 11, p. 633-675, 1995.
- MORDUE, D.G. & SIBLEY, L. D. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *The Journal of Immunology*, v. 156, p. 4452-4459, 1997.

- MUSTAFA, S. B. & OLSON, M. S. Effects of calcium channels antagonists on LPS-induced hepatic iNOS expression. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. 351-360, 1999.
- NICHOLS, B. A. & O'CONNOR, G. R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. **Laboratory Investigation**, v. 44, n. 4, p. 324-335, 1981.
- NOWAK, G., PESTIC-DRAGOVICH, L., HOZÁK, P., PHILIMONENKO, A., SIMERLY, C., SCHATTEN, G. & LANEROLLE, P. Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 27, p. 17176-17181, 1997.
- ORTEGA-BARRIA, E. & BOOTHROYD, J. C. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 3, p. 1267-1276, 1999.
- OSHIMI, Y., MIYAZAKI, S. & ODA, S. ATP-induced Ca^{2+} response mediated by P2U and P2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages. **Immunology**, v. 98, n. 2, p. 220-227, 1999.
- PAN, J., BURGHER, K. L. & SZSZEPANIK, G. E. Tyrosin phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. **Biochemical Journal**, v. 314, p. 889-894, 1996.

- PARK, Y. C., JUN, C. D., KANG, H. S., KIM, H. D. & CHUNG, H. T. Intracellular Ca^{2+} pool depletion is linked to the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. **Biochemical Molecular Biology**, v. 36, n. 5, p. 949, 1995.
- PARK, Y. C., JUN, C. D., KANG, H. S., KIM, H. D., KIM, H. M. & CHUNG, H. T. Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 87, n. 2, p. 296-302, 1996.
- PASTURAL, E., BARRAT, F. J., DUFOURCQ-LAGELOUSE, R., CERTAIN, S., SANAL, O., JABADO, N., SEGER, R., GRISCELLI, C., FISHER, A. & BASILE, G. S. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. **Nature Genetics**, v. 16, p. 289-292, 1997.
- RABINOWITZ, S., HORSTMANN, H., GORDON, S. & GRIFFITHS, G. Immunocytochemical characterization of endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. **The Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 1, p. 95-112, 1992.
- RICHELME, F., BENOLIEL, A. M. & BONGRAND, P. Dynamic study of cell mechanical and structural responses to rapid changes of calcium level. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 45, n. 2, p. 93-105, 2000.
- ROCHLIN, M. W., ITOH, K., ADELSTEIN, R. S. & BRIDGMAN, P. C. Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 3661-3670, 1995.

- SHAW, M. K. & TILNEY, L. G. Induction of na acrossomal process in *Toxoplasma gondii*: Visualization of actin filaments in a protozoan parasite. **Proceedings of the National Academy of Science USA.**, v. 96, p. 9095-9099, 1999.
- 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.
- SIBLEY, L. D. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Cell Biology**, v. 5, p. 129-132, 1995.
- SILVA, N. M., GAZZINELLI, R. T., SILVA, D. A., FERRO, E. A., KASPER, L. H. & MINEO, J. R. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during in vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3959-3963, 1998.
- SKEEN, 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.
- SKOWRON, J.F., BEMENT, W. M. & MOOSEKER, M. S. Human brush border myosin-I and myosin-Ic expression in human intestine and Caco-2BBE cells. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 41, n. 4, p. 308-324, 1998.

SMALL, J. V., ROTTNER, K. & KAVERINA, I. Functional design in the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 54-60, 1999.

STENDAHL, O. I., HARTWING, J. H., BROTSCHI, E. A. & STOSSEL, T. P. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 84, p. 215-224, 1980.

SUJENA, S. K. & POTASHNER, S. J. Quantification of a neurotrophin receptor from submilligram quantities of brain tissue using Western blotting. **Brain Research Protocols**, v. 3, p. 88-93, 1998.

SUTER, D. M. & FORSCHER, P. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, p. 106-116, 1998.

SUTER, D. M., ESPINDOLA, F. S., LIN, C., FORSCHER, P. & MOOSEKER, M. S. Localization of unconventional myosins V and VI in neural growth cones. **Journal of Neurobiology**, v. 42, p. 370-382, 2000.

SWANSON, J. A., JOHNSON, M. T., BENINGO, K., POST, P., MOOSEKER, M. & ARAKI, N. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 307-316, 1999.

TABB, J. S., MOLYNEAUX, B. J., COHEN, D. L., KUZNETSOV, S. A., LANGFORD, G. M. Transport of RE vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 3221-3234, 1998.

TOWBIN, H., STACHCLIN, T. & GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 76, p.4350-4354, 1979.

TRYBUS, K. M., KREMENTSOVA, E. & FREYZON, Y. Kinetic characterization of a monomeric unconventional myosin V construct. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 39, p. 27448-27456, 1999.

WELLS, A. L., LIN, A. W., CHEN, L. Q., SAFER, D., CAIN, S. M., HASSON, T., CARRAGHER, B. O., MILLIGAN, L. A. & SWEENEY, H. L. Myosin V is an actin-based motor that moves backwards. **Nature**, v. 401, p. 505-508, 1999.

WIRTH, J. A., JENSEN, K. A., POST, P. L., BEMENT, W. M. & MOOSEKER, M. S. Human myosin-Ixb, na unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 653-661, 1996.

WÜLFING, C. & DAVIS, M. M. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. **Science**, v.282, p. 2266-2269, 1998.

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.

YUAN, T., VOGEL, H. J., SUTHERLAND, C. & WALSH, M. P. Characterization of the Ca^{2+} -dependent and -independent interactions between calmodulin and its binding domain of inducible NOS. **FEBS Letter**, v. 431, n. 2, p. 210-214, 1998.

FU-00011001-2