

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

**Papel da proteína de superfície SAG2A de *Toxoplasma gondii*
na regulação da resposta imune inata de hospedeiros
murinos**

ARLINDO GOMES DE MACÊDO JÚNIOR

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

**Papel da proteína de superfície SAG2A de *Toxoplasma gondii*
na regulação da resposta imune inata de hospedeiros
murinos**

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

ARLINDO GOMES DE MACÊDO JÚNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JAIR PEREIRA CUNHA JÚNIOR

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M141p Macêdo Júnior, Arlindo Gomes de, 1984-

Papel da proteína de superfície SAG2A de *Toxoplasma gondii* na regulação da resposta imune inata de hospedeiros murinos [manuscrito]

/ Arlindo Gomes de Macêdo Júnior. - 2010.

68 f. : il.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

Co-orientador: Jair Pereira Cunha Júnior.

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

Inclui bibliografia.

- 1. 1. Toxoplasma gondii - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Cunha Júnior, Jair Pereira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.**
- 2. IV. Título.**

CDU: 576.893.192

***A Deus pela força me dada para conquistar
os meus objetivos.***

***Aos meus queridos pais Arlindo e Mirani Macêdo
pelo amor, cuidado e atenção.***

***A meu irmão Otávio Macêdo pelo seu
amor e cumplicidade.***

***Aos amados amigos que me abraçaram e choraram
comigo no momento em que foi preciso.***

***“Se fiz descobertas valiosas,
foi mais por ter paciência
do que qualquer outro talento.”
(Isaac Newton)***

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me fazer cada dia mais paciente me dando coragem para prosseguir e conquistar os meus objetivos.

Aos meus professores Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Dra. Deise A. O. Silva e Dr. Jose Roberto Mineo pelos ensinamentos e grande paciência para comigo. Obrigado por todo tempo dedicado ao meu crescimento profissional.

Aos amigos e colaboradores da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC Ilhéus/BA por disponibilização de insumos e conhecimentos fundamentais para a realização deste trabalho. Ao Professor DR. Carlos Priminho Pirovani por todo tempo dedicado ao meu ensinamento técnico e científico.

Ao meu amado amigo Biomédico e inseparável Thalís Ferreira pelo companheirismo, cumplicidade e presença durante momentos difíceis nesses dois últimos anos.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Alvaro, Ana Cláudia, Anatália, Angélica, Bellisa, Bia, Caroline, Celene, Cristina, Dâmaso, Everton, Fabiane, Fernanda Pantaleão, Fernanda Santiago, Flávia, Gabriela, Hercílio, Juliana, Juliane Vargas, Letícia, Mariana, Murilo, Pablo, Poly, Silas e Willian pela amizade, convívio e conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Edílge Maria de Gouveia, Zilda Mendonça da Silva Rodrigues e Marley Dantas Barbosa pelo apoio na rotina laboratorial.

Aos secretários, Max, Luceleide Damasio e Lucélia Assis, pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo vital do <i>Toxoplasma gondii</i>	17
Figura 2. Mapa do plasmídeo pET28a utilizado para inserção dos fragmentos SAG2A e SAG2A ^{Δ135} amplificados.....	27
Figura 3. Clivagem do vetor pET28a e amplificação dos fragmentos das proteínas SAG2A e SAG2A ^{Δ135}	35
Figura 4. Perfil de indução de diferentes clones de Bactérias expressando as proteínas SAG2A recombinantes em meio LB.....	36
Figura 5. Perfil de frações obtidas da purificação da proteína SAG2A e SAG2A ^{Δ135} em coluna com resina Chellating-Sepharose fast flow.....	37
Figura 6. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% da proteína recombinante SAG2A após gel filtração.....	38
Figura 7. Perfil eletroforético das frações provenientes de purificação do anticorpo monoclonal A4D12.....	39
Figura 8. Identificação de SAG2A por <i>immunoblotting</i> em fração da proteína recombinante purificadas sondados com os mAbs A3A4 e A4D12 e soro policlonal.....	40
Figura 9. Reconhecimento da SAG2A em <i>slot blot</i> por anticorpo monoclonal A4D12 em diferentes preparações de <i>Toxoplasma gondii</i>	41
Figura 10. Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> modula a resposta de macrófagos e células dendríticas.....	43
Figura 11. Mecanismo de supressão de células dendríticas derivadas de medula óssea por <i>Toxoplasma gondii</i> é independente de TLR4.....	44
Figura 12. Efeito de inibição do <i>Toxoplasma gondii</i> não requer interação de parasitos vivos com células do sistema imune inato.....	45

Figura 13. O bloqueio do epítipo imunodominante da proteína SAG2A por mAb A4D12 reverte parcialmente a modulação negativa de células do sistema imune inato induzidas por <i>Toxoplasma gondii</i>	47
Figura 14. Supressão de células do sistema imune inato por SAG2A é dose dependente.....	48
Figura 15. Região C-terminal da proteína SAG2A tem potencial supressor da ativação imune inata induzida por essa proteína.....	50
Figura 16. Proteína SAG2A possui variados <i>motifs</i> ativos com potencial função modulatória da resposta imune inata.....	51
Figura 17. Indução da produção de IL-10 por concentrações decrescentes das pra proteínas rSAG2A e rSAG2A ^{Δ135} em macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) após 48 horas.....	52
Figura 18. Proteína SAG2A possui sítio semelhante ao local de ligação de IL-6 ao receptor de citocina	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas alvo de estudo para o entendimento da interação do *T. gondii* com o processo de evasão, estimulação e modulação da resposta imune do hospedeiro..... 21

Tabela 2. *Primers* para obtenção dos fragmentos de SAG2A e SAG2A^{Δ135} utilizados na clonagem e expressão..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA - Ácido Bicincônico;

BMDCs - Células Dendríticas Derivada de Medula Óssea;

BSA - Soroalbumina Bovina;

BSR - Sequência Relacionada à Bradizofta;

cAMP - Monofosfato de Adenosina Cíclico;

CD74 - *Cluster* de Diferenciação 74;

CK2 - Caseína Kinase II;

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

ELISA - Ensaio Imunoenzimático;

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago;

GPI - Glicosilfosfatidilinositol;

HSP70 - Proteína do Choque Térmico 70;

IL-12 - Interleucina 12;

IL-6 - Interleucina 6;

IL-10 - Interleucina 10;

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactósideo;

LPS - Lipopolissacarídeo;

mAb - Anticorpo Monoclonal;

MIF - Fator de Inibição da Migração de Macrófago;

MOI - *Multiplicity of Infection*;

M Φ - Macrófagos Derivados de Medula Óssea;

NO - Óxido Nítrico;

OD - Densidade Óptica;

PBS - Tampão Fosfato Salino;

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase;

PKC - Proteína Kinase C;

PMSF - Fenil-Metilsulfonil Fluoreto;

SAG - Antígenos de Superfície;

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio;

SFB - Soro Fetal Bovino;

SRS - Antígenos Relacionados à SAG;

STAgMe – Antígenos Solúveis de *T. gondii* da Cepa Me49;

STAgRH - Antígenos Solúveis de *T. gondii* da Cepa RH;

SUSA - Antígenos Não Relacionados à SAG;

TLR – Receptores *Toll-like*;

TMB – Tetrametilbenzidina;

VOID - Componentes que Não se Ligaram na Coluna de Purificação Protéica;

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Importância epidemiológica da Toxoplasmose	15
1.2. Parasito.....	16
1.3. Resposta imune.....	18
1.4. Relação parasito-hospedeiro.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Camundongos.....	23
3.2. Parasito e linhagens celulares.....	23
3.3. Preparações de antígenos.....	23
3.4. Produção de anticorpos monoclonais.....	24
3.5. Construção de plasmídeo, expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	25
3.6. Análise de bioinformática	28
3.7. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).....	28
3.8. <i>Immunoblotting</i>	29
3.9. Diferenciação de células derivadas da medula óssea.....	29

3.10. Tratamento de células e parasitos	30
3.11. Detecção de atividade anti-IL-6 de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
3.12. Quantificação de citocinas por ELISA.....	31
3.13. Quantificação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	31
3.14. Análises estatísticas.....	31
 4. RESULTADOS	 33
4.1. Clonagem, purificação e expressão da proteína SAG2A recombinante.....	33
4.2. Infecção por <i>T. gondii</i> regula a resposta de macrófagos e células dendríticas.....	42
 5. DISCUSSÃO	 54
 6. CONCLUSÕES	 59
 REFERÊNCIAS	 60

RESUMO

Toxoplasma gondii é conhecido por modular a resposta imune pró-inflamatória desencadeada por agonistas de receptores tipo *Toll* e, neste contexto, tem sido amplamente utilizado como modelo de subversão da imunidade inata. No presente trabalho, um dos possíveis mecanismos pelos quais o parasita é capaz de impedir a produção de óxido nítrico e IL - 12 por macrófagos ativados e células dendríticas ativados é relatado. Foi encontrado que a imunomodulação induzida pelo parasita é independente da invasão pelo parasito vivo e de sua replicação, apresentando padrões distintos dependendo do tipo de cepa utilizada (tipo I ou II). O bloqueio da proteína de superfície por SAG2A por monoclonal específico reverteu a supressão de células ativadas de forma dose dependente. Análises adicionais indicaram que a modulação imune inata induzida através da SAG2A depende da presença da região C-terminal da proteína. Além disso, a análise *in silico* revelou que a proteína apresenta diversos sítios de fosforilação intracelular de quinases e AMPc do hospedeiro e um sequência ortóloga da cadeia- α do receptor de IL-6 humano e murino, o qual mostrou-se capaz de ligar-se a essa citocina. Assim, a presença de SAG2A em *T. gondii* é capaz de modular as respostas imune inatas e contribui para mecanismos de evasão do parasita frente a resposta efetora induzida pelo hospedeiro.

Palavras Chaves: *Toxoplasma gondii*, SAG2A, Evasão imune, Macrófagos, Células Dendríticas.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is known to shut down pro-inflammatory responses triggered by Toll-like receptor agonists and, in this sense, has been widely used as a model for subversion of innate immunity. Here, we describe one of the possible mechanisms by which the parasite is able to down regulate nitric oxide and IL-12 production by activated macrophages and dendritic cells. We show that parasite-induced immunomodulation is independent of live invasion and replication, and presented distinct patterns depending on the type of strain used (type I or II). Strikingly, blockage of SAG2A surface protein by specific monoclonal antibody reverted the suppression of activated cells in a dose-dependent manner. Further analysis indicated that the innate immune modulation induced by the molecule depends on the presence of the intact C-terminal region of the protein. Additionally, in silico analysis revealed that the protein presents diverse phosphorylation sites of hosts' intracellular kinases and cAMP, in addition to an orthologue of the human IL-6 binding site at the cytokine α -chain receptor, which is shown to actively bind the cytokine. Altogether, we demonstrate that SAG2A by *T. gondii* is able to modulate innate immune responses and contributes to parasite evasion of effectors mechanisms induced by the host.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, SAG2A, Immune evasion, Macrophage, Dendritic cell

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância epidemiológica da toxoplasmose

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, que caracteriza-se por uma doença de importância médica e veterinária, podendo ocasionar doenças congênitas e abortos (BHOPALE, 2003). Segundo dados epidemiológicos, aproximadamente um terço da população mundial é soropositiva para *T. gondii*, sendo esta soroprevalência variante entre 10 a 80% e correlacionada a condições sócio-culturais e de higiene entre as populações estudadas (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; MONTOYA e ROSSO, 2005).

Em pacientes imunocompetentes a toxoplasmose geralmente apresenta-se como uma infecção assintomática, porém indivíduos podem apresentar linfadenopatia e sintomatologia ocular (HILL e DUBEY, 2002; MILLER et al, 2009). Entretanto, indivíduos imunodeprimidos desenvolvem grave quadro neurológico em decorrência da reativação do processo infeccioso crônico (HEGAB e MUTAWA, 2004). Pacientes HIV positivos frequentemente apresentam doença de caráter agudo, com a presença de encefalite, retinite, miocardite e morte (HILL e DUBEY, 2002; KONG et al, 2003; GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004).

A toxoplasmose congênita é considerada importante causa mundial de mortalidade e morbidade no homem e nos animais (BHOPALE, 2003; GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004). Os mecanismos da transmissão vertical ainda não são bem conhecidos, porém sabe-se que o mecanismo de infecção é baseado na invasão da placenta por taquizoítos durante a primo infecção (HEGAB e MUTAWA, 2004), uma vez que o contato prévio da mãe com o parasito gera uma infecção perene e imunidade protetora (DALGIÇ, 2008). No Brasil, inquéritos epidemiológicos têm demonstrado uma prevalência de anticorpos específicos para *T. gondii* em gestantes ao redor de 50 a 76%, com ocorrência de toxoplasmose congênita entre 0,2 e 2% (CANTOS et al, 2000; SEGUNDO et al, 2002; CARMO et al, 2005). No caso de primo infecção materna, os riscos relacionados à morbidade e mortalidade da infecção fetal concentram-se na idade gestacional sendo a gravidade das lesões inversamente proporcional ao tempo de gestação: no primeiro trimestre há 13% de probabilidade de lesões graves, 10% no

segundo trimestre e no terceiro trimestre as lesões podem estar ausentes (CANTOS et al, 2000; TENTER, HECKERITH e WEISS, 2000; CARMO et al, 2005).

1.2. Parasito

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, família Sarcocystidae, sendo descoberto simultaneamente em 1908 em coelhos no Brasil por Splendore e em um roedor do norte da África, *Ctenodactylus gundi*, por Nicolle & Manceaux.

T. gondii possui um ciclo vital sexuado (Figura 1), que ocorre apenas no epitélio intestinal de espécies de felinos, mais particularmente os gatos, e um assexuado, acontecendo em felinos, mamíferos e aves que desempenham o papel de hospedeiros intermediários (TENTER, HECKERITH e WEISS, 2000; SUKTHANA, 2006). Seus hospedeiros definitivos entram em contato com o parasito por meio de predatismo, por meio de tecidos musculares e nervosos contendo cistos teciduais. Estas formas de latência sofrem digestão por enzimas proteolíticas do estômago e intestino liberando taquizoítos que invadem a lâmina própria do intestino com o intuito de multiplicarem-se (DUBEY, 2004). Dentro das células, os taquizoítos (formas de replicação rápida) multiplicam-se inicialmente de forma assexuada por esquizogonia, produzindo uma nova geração a cada oito horas (BLACK e BOOTHROYD, 2000). No entanto, alguns esquizontes se diferenciam em gametócitos que, através de processo de maturação, resultam em macro e microgametas para formarem oocistos, os quais são as formas de contaminação ambiental resultantes do ciclo sexuado parasitário (MAROBIM et al, 2004). Os oocistos formados abandonam as células epiteliais antes de completarem seu desenvolvimento, sendo eliminados nas fezes para o exterior do organismo do felino (DUBEY, 2004). Na presença de oxigênio e de umidade os oocistos amadurecem entre dois a cinco dias produzindo no seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítas cada e uma massa de citoplasma residual. Após tornarem-se maduros, passam a ser infectantes se ingeridos ou inalados por gatos ou outros vertebrados suscetíveis (CLEARY et al, 2002; MAROBIM et al, 2004).

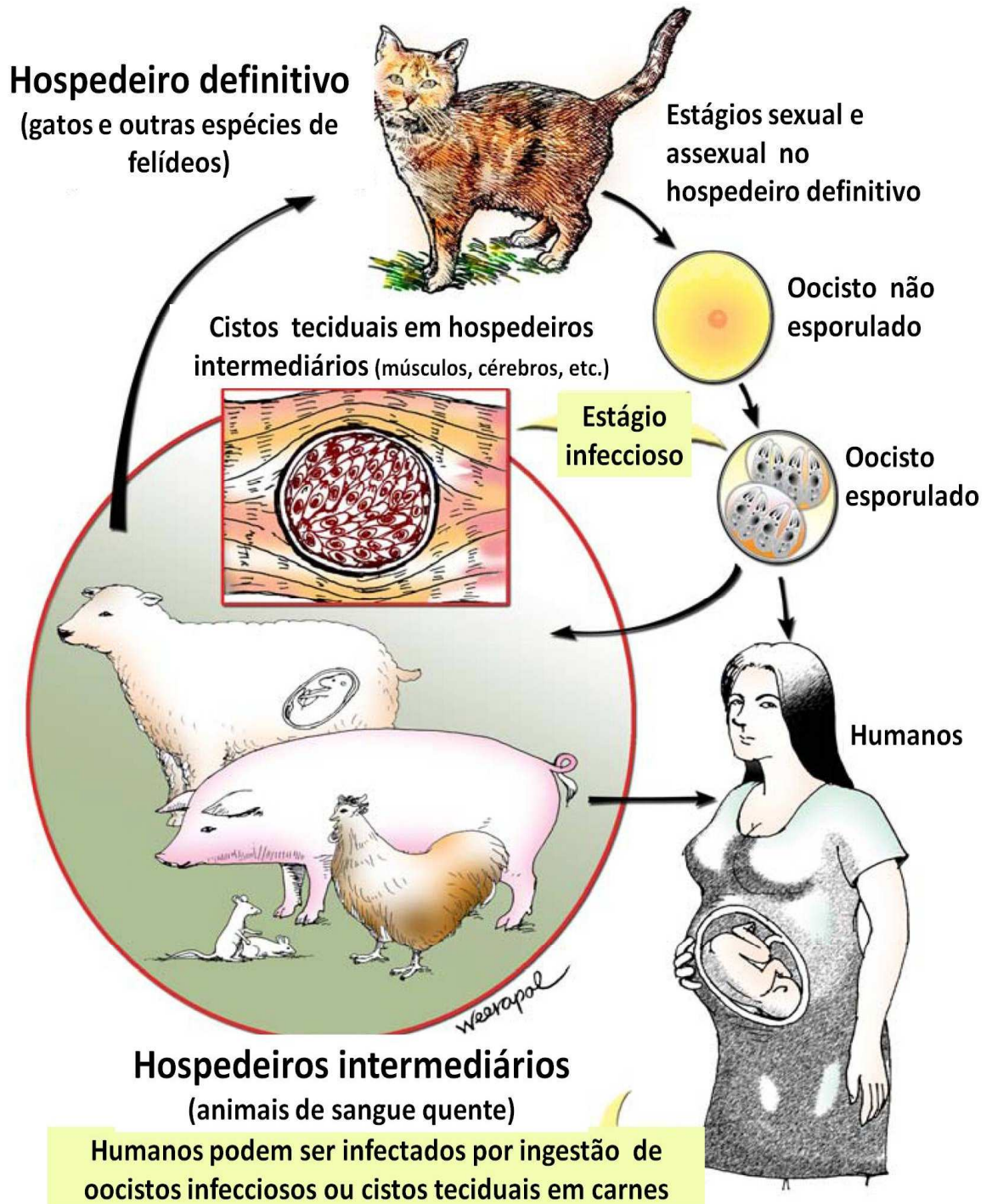


Figura 1. Ciclo vital de *Toxoplasma gondii*. (adaptado de TAWREENAN, 2004).

Após a entrada no organismo do hospedeiro, a penetração celular torna-se um elemento chave para a sobrevivência do parasito. A invasão do parasito à célula hospedeira é um processo complexo, no qual o parasito utiliza a motilidade baseada no sistema actino-miosina para alcançar a célula hospedeira e se posicionar de maneira que a região apical do parasito possa estar voltada para a interface celular (DOBROWOLSKI, CARRUTHERS e SIBLEY, 1997; HETMAN, et al, 2000; HEINTZELMAN e SCHWARTZMAN, 2001). A adesão inicial do parasito é mediada em parte pelos antígenos de superfície. Estas moléculas estão envolvidas na redução da força repulsiva entre cargas negativas estabelecidas pelos fosfolipídios de membrana da célula e do parasito (CARRUTHERS, 2002; JUNG, LEE e GRIGG, 2004).

O processo de penetração do parasito na célula do hospedeiro também envolve uma série de eventos incluindo protusão do conóide (região anterior do parasito), exocitose do conteúdo das roptrias e micronemas que facilitam a endocitose através da desestabilização da membrana celular do hospedeiro, culminando com a formação da membrana do vacúolo parasitóforo (PVM). É dentro desse vacúolo que ocorre a replicação assexuada pelo processo de endodiogenia ou endogenia (MINEO, KHAN e KASPER, 1994; SIBLEY et al, 2003).

1.3. Resposta imune

A resposta imune protetora à infecção por *T. gondii* é mediada por interação ocasionada por invasão parasitária e resposta do hospedeiro por fagócitos, linfócitos B e T e células natural *killer* (HEGAB e MUTAWA, 2003). Acredita-se que os linfócitos intra-epiteliais em conjunto com linfócitos provenientes dos linfonodos mesentéricos sejam os responsáveis como primeira linha de defesa do organismo para prevenir a invasão celular através da liberação de varias citocinas, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (BHOPALE, 2003; MONTROYA e LIENSEFELD, 2004). A IL-12 produzida por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos estimula a liberação de IFN- γ por linfócitos T e Células NK controlando assim a infecção parasitária (MILLER et al, 2009).

Nos hospedeiros não-imunes, a fase aguda caracteriza-se pela multiplicação parasitária rápida que leva a formação de pseudocistos que se rompem liberando novos parasitos que podem invadir outras células adjacentes (TENTER, HECKERITH e WEISS, 2000). Na fase crônica da infecção, quando o hospedeiro desenvolve a imunidade, o

parasito *T. gondii* replica-se muito lentamente (bradizoítos) formando grandes aglomerados parasitários que segregam envoltório cístico tornando-o mais resistente às condições ambientais e a medicamentos (BHOPALE, 2003). Estudos experimentais *in vitro* revelaram que modificações do microambiente onde se encontra o parasito *T. gondii*, como aumento do pH, variação da temperatura, tratamento com IFN- γ , inibição da respiração mitocondrial, presença de NO e *stress* químicos induzem a transformação de taquizoítos em bradizoítos (LYONS, MCLEOD e ROBERTS, 2002; GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004).

O sucesso de *T. gondii* depende do balanço entre a resposta do hospedeiro, que visa eliminar o parasito e estratégias de evasão e imunomodulação do parasito. Recentes estudos têm mostrado que *T. gondii* é capaz de ativamente interferir com funções modulatórias de macrófagos através do bloqueio de citocinas induzidas pelo reconhecimento do TLR2 pelo LPS, inibição de IL-12 e TNF- α e supressão da produção de óxido nítrico (LENG, BUTCHER e DENKERS, 2009). Assim, o sistema imune possui o desafio de controlar a infecção e ao mesmo tempo minimizar os danos teciduais causados por processos imunopatológicos (MILLER et al, 2009). A presença de citocinas anti-inflamatórias assumem dessa forma importante papel na diminuição da resposta inflamatória à infecção por *T. gondii* (MILLER et al, 2009; POLLARD, KNOLL e MORDUE, 2009).

Durante a infecção por *T. gondii*, a indução de IL-12 ocorre pela interação de antígenos parasitários com receptor de quimiocina 5 (CCR5) e receptores *Toll-like* (TLR) (MILLER et al, 2009; POLLARD, KNOLL e MORDUE, 2009). Camundongos deficientes de CCR5 revelam uma diminuição na produção de IL-12 e um aumento na suscetibilidade à infecção por *T. gondii* (BLADER e SAEIJ, 2009; POLLARD, KNOLL e MORDUE, 2009). Os TLRs são encontrados em diferentes células do sistema imune e diferentes subtipos de células podem expressar diferentes repertórios de TLRs com importância para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (MILLER et al, 2009). Estudos mostram que camundongos deficientes de TLR11 (ligante de profilina, proteína conservada em Apicomplexa), são mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* revelando a importância desses TLRs para o controle da toxoplasmose (BLADER e SAEIJ, 2009; LENG, BUTCHER e DENKERS, 2009).

1.4. Relação parasito-hospedeiro

Com o objetivo de compreender a interação parasito-hospedeiro, pesquisadores vêm estudando proteínas do parasito envolvidas na invasão celular do hospedeiro, modulação imunológica e/ou atenuação da virulência criando um microambiente necessário à sua proteção no hospedeiro (LEKUTIS et al, 2001; KIM e BOOTHROYD et al, 2005; RISCO-CASTILHO et al, 2007).

Estudos mostram que diversas proteínas do parasito estão envolvidas na evasão imune e consequente replicação do parasito. Proteínas de roptrias têm sido amplamente estudadas e revelaram-se como importantes ferramentas de imunomodulação utilizadas pelo parasito. Como exemplo, relatou-se que o aumento da expressão de ROP18 resulta na ausência de controle da replicação parasitária, sendo este um importante fator de virulência de *T. gondii* (HAJJ et al, 2007; SINAI, 2007). De forma semelhante, demonstrou-se que ROP16 está envolvida na ativação de STAT3 e consequente supressão de citocinas pró-inflamatórias importantes no controle da infecção (YAMAMOTO et al, 2009).

Entre as diversas classes de proteínas de *T. gondii* estudadas, identificam-se as proteínas da família das SAG (antígenos de superfície), SRS (antígenos relacionados à SAG) e SUSA (antígenos não relacionados à SAG) (BLADER e SAEIJ, 2009; LEKUTIS et al, 2001) (Tabela 1). As proteínas SAG possuem um peptídeo sinal N-terminal que auxilia o transporte destas proteínas à superfície do parasito e uma região C-terminal hidrofóbica ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI). A família SRS é dividida em dois grupos: família SAG1 (SAG1, SAG3, SRS1-SRS4, BSR4) e SAG2 (SAG2A, SAG2B, SAG2C, SAG2D, SAG2XY) que interagem com as células do hospedeiro facilitando a invasão celular e evasão da resposta imune (LEKUTIS et al, 2001; VAN et al, 2007). As SRS são altamente polimórficas e fazem parte da superfamília de superfície que são ancorados através de âncora de GPI. A estrutura das SRS sugere possível papel como moléculas de adesão celular. Estudos revelaram que alguns anticorpos monoclonais anti-SAG1 são capazes de inibir a ligação e invasão de parasitos a célula hospedeira (GRIMWOOD e SMITH, 1996). SAG1 e SAG2C são dominantes na indução à resposta humoral da fase aguda da infecção e SAG1 também ativa linfócitos T a produzirem IFN- γ (KIM e BOOTHROYD et al, 2005).

O extenso polimorfismo encontrado às SRS revela que esses antígenos sofreram pressão seletiva da resposta imune (KIM e BOOTHROYD, 2005; VAN et al, 2007). SAG2

de *T. gondii* é uma das importantes proteínas de superfície conhecida como ligante de membrana sendo utilizada no diagnóstico sorológico e no desenvolvimento de protocolos imunoproláticos por possuir boa antigenicidade e imunogenicidade (HUANG et al, 2002; CONG et al, 2005). Neste sentido, nós investigamos o papel da proteína SAG2A de *T. gondii* no processo de evasão da resposta à células imunes.

Tabela 1. Proteínas alvo de estudo para o entendimento da interação de *T. gondii* com o processo de evasão, estimulação e modulação da resposta imune do hospedeiro.

Estágio	Taquizoíto	Bradizoíto
Proteínas de Membrana	SAG1	SAG2CD
	SAG2AB	SAG3
	SAG3	SAG4A
	SAG5BC	SAG5A
	SRS1-3	BSR4
		SRS9

Fonte: LEKUTIS et al, 2001; LYONS, MCLEOD e ROBERTS, 2002; GROSS, HOLPERT e GOEBEL, 2004; KIM e BOOTHROYD, 2005. SAG (antígeno de superfície); BSR (sequência relacionada à bradizoíto); SRS (sequência relacionada à SAG1).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel da proteína SAG2A de *Toxoplasma gondii* na regulação da resposta imune inata em modelo murino.

2.2. Objetivos específicos

- Clonar, expressar e purificar proteína SAG2A recombinante;
- Avaliar a funcionalidade antigênica da proteína SAG2A recombinante;
- Avaliar o papel e mecanismo modulatório de *T. gondii* em células do compartimento inato do sistema imune;
- Desvendar o papel do epítipo imunodominante reconhecido pelo anticorpo monoclonal A4D12 quanto aos fenômenos imunomodulatórios induzidos por *T. gondii*;
- Analisar *motifs* conservados na proteína SAG2A e descrever efeitos biológicos relacionados aos sítios ativos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Camundongos

Camundongos da linhagem C57BL/6 de seis a oito semanas de idade foram mantidos no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Escola de Medicina de Ribeirão Preto, USP Ribeirão Preto, Brasil, com água e alimentação *ad libitum*. A manutenção e cuidado desses animais foram efetuadas em conformidades com o guia do Comitê de Ética de Animais de Laboratório da FMRP/USP. Para realização dos experimentos os camundongos foram trazidos da Escola de Medicina de Ribeirão Preto para Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG. A manutenção e manipulação experimental dos camundongos foram executadas em condições livres de patógenos específicos e de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal descritos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.2. Parasito e linhagens celulares

Células HeLa (ATCC CCL-2), L929 (ATCC CCL-1) foram mantidas em frascos de cultura em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina, 10 mM HEPES e 50 µg/ml de penicilina e estreptomicina a 37 °C em 5% de CO₂, sendo repicadas por tripisinização, mediante confluência da monocamada celular. *Toxoplasma gondii* das cepas RH e Me49 foram cultivadas em células HeLa em frascos de culturas em meio RPMI 1640 suplementado com 2% SFB a 37 °C em 5% de CO₂.

3.3. Preparações de antígenos

Taquizoítos da cepa RH foram mantidos por passagens intraperitoniais em camundongos Swiss em intervalos de 2 a 3 dias. (MINEO et al, 1980). Para colheita dos parasitos, o exsudado peritoneal dos animais foi colhido e centrifugado a 45 x g por 1 minuto, para a remoção de células e debris. A seguir, o sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O sedimento enriquecido em parasitos foi lavado por mais duas vezes em solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7.2 (PBS) e, quando necessário para a remoção de hemácias, tratado com solução tampão de

lise (NH_4Cl 14 mM e TRIS-HCl 17 mM pH 7,2) por 1 minuto a temperatura ambiente. Já os antígenos de taquizoítos da cepa Me49 foram obtidos a partir da infecção em monocamadas de linhagem de L929 (ATCC CCL-1), mantidos em meio RPMI completo suplementado de soro fetal bovino 2%. Após o cultivo de 2-3 semanas as formas taquizoítos foram coletas dos frascos de cultura e parcialmente purificados como descrito para a cepa RH.

Terminado os ciclos de centrifugação de amostras contendo parasitos da cepa RH e Me49, as suspensões de parasitos foram diluídas em PBS e suplementadas com inibidores de proteases, aprotinina $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, leupeptina $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ e PMSF (fenil-metillsulfonil fluoreto) 1,6 mM e submetidas a seis ciclos de congelamento em N_2 líquido e descongelamento a 37°C seguido por sonicação durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo (SCOTT et al., 1987). Após este tratamento os parasitos lisados eram submetidos à centrifugação a $1000 \times g$, por 15 minutos a 4°C e a fração sobrenadante resultante coletada e quantificada utilizando o método de dosagem Ácido Bicincônico (BCA). Antígenos solúveis de *T. gondii* da cepa RH (STAgRH) e da cepa Me49 (STAgMe) foram armazenados a -20°C , até serem utilizados para os ensaios de estímulo celular e *immunoblotting*.

3.4. Produção de anticorpos monoclonais

Taquizoítos de *T. gondii* (RH) foram coletados de exudato peritonial e parcialmente purificados como descrito acima, fixados com acetona 30% em PBS por 4°C durante 72 horas. Após a fixação, os parasitos foram lavados em solução PBS e utilizados para imunização de camundongos BALB/c. Os animais foram imunizados por via intraperitonial utilizando um volume de $100 \mu\text{l}$ de uma suspensão de 1×10^7 parasitos ml^{-1} em intervalos regulares de 15 dias em três inoculações sucessivas. Sete dias antes da realização do processo de fusão, os animais foram inoculados com a mesma concentração de parasitos, porém por via endovenosa. A produção dos hibridomas foi conduzida como previamente descrito por (KOHLER E MILSTEIN, 1975) com pequenas modificações. Após o término do esquema de imunização, os baços dos animais foram coletados em meio DMEM sem soro fetal bovino e em ambiente estéril e misturados à suspensão de células de mieloma murino SP20/Ag14 na proporção de 1:1. A seguir, as populações mistas de células foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 10

minutos, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento adicionou-se lentamente polietilenoglicol 1500 na concentração de 50%, sob agitação constante a 37 °C durante um minuto, quando então completou-se o volume para 50 ml em DMEM sem soro fetal bovino. As células foram lavadas por duas vezes e semeadas em meio HAT/HT (Sigma Chemical Co.) contendo 20% de soro fetal bovino para a seleção das células fusionadas (hibridomas) por período de 21 dias. Hibridomas secretando anticorpos foram selecionados por ELISA indireto e clonados por diluição limitante em placas de 96 orifícios. Os hibridomas clonados foram amplificados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, glutamina 2 mM, 2-β-mercaptoetanol 50 μM e getamicina 40 μg/ml e estocados em N2 líquido.

A purificação de anticorpo monoclonal (mAb) A4D12 foi realizada através de cromatografia em coluna por afinidade utilizando proteína G-sepharose. Para a preparação do aplicado sobrenadante de cultura de hibridoma foi diluído em tampão Fosfato 0,1 M pH 8,0. Em seguida, componentes que não se ligaram na coluna (*void*) foram coletados e a coluna lavada com tampão Fosfato 0,1 M pH 8,0. A coluna G-sepharose foi eluída com tampão Glicina 0,1 M pH 2,0 e o pH das frações foi neutralizado com Tris-base. Amostras representativas da purificação foram aplicadas em gel SDS-PAGE objetivando analisar o perfil eletroforético da purificação.

3.5. Construção de plasmídeo, expressão e purificação de proteínas recombinantes

DNA genômico proveniente de taquizoítos de *T. gondii* cepa RH foi isolado como previamente descrito (LEKUTIS et al, 2000) e utilizado como template para amplificação do fragmento gênico da SAG2A em reação em cadeia de polimerase (PCR) através da utilização de *primers* do sítio *NdeI upstream* e *HindIII downstream* baseados em depósito no GenBank (número de acesso AA072427). Para amplificação do fragmento gênico respectivo à SAG2A e alternativamente para amplificação do fragmento SAG2A deletada (proteína sem a região C-terminal constituída do epítipo reconhecido pelo mAb A4D12) utilizou-se do conjunto de *primers* descrito na Tabela 2. Essa estratégia de amplificação resultou em fragmento com cerca de 349 pb semelhante ao fragmento gênico da SAG2A deletado de 135 aminoácidos correspondente à região C-terminal (SAG2A^{Δ135}).

Tabela 2. Primers para obtenção dos fragmentos de SAG2A e SAG2A^{Δ135} utilizados na clonagem e expressão.

Produto	Primer	Sequência 5' – 3'	Tamanho (pb)
SAG2A	Forward Nde 1	CAAGTTCGCTCATATGTCCACCACCG	607
	Reverso Hind3	GACTTTCGCAAAGCTTCTCCGAAAG	
SAG2A ^{Δ135}	Forward Nde1	CAAGTTCGCTCATATGTCCACCACCG	349
	Reverso Hind3	AGAACCATCAAAGCTTCGACCAGCG	

Os produtos da PCR foram digeridos por enzimas de restrição e inseridos no sítio NdeI/HindII do vetor pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha) (Figura 2) e utilizado para produção da proteína em fusão com His-Tag (LIN et al, 2007). *E. coli* Rosetta cepa DE3 foram utilizadas para clonagem e expressão das proteínas recombinantes. *E. coli* Rosetta cepa DE3 transformada com o inserto PET28aSAG2A e PET28aSAG2A^{Δ135} foram cultivadas em meio LB na presença de 100 µg/ml de kanamicina e 100 µg/ml de clorafenicol com crescimento a temperatura de 37 °C para atingir a densidade óptica (OD) de 0,5 a 600 nm. A expressão das proteínas foi induzida com 1 mM isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG; Sigma) por 4 horas a 37 °C. As células foram colhidas por centrifugação e os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (50 mM de tampão fosfato, pH 8,0) contendo 0,1% Triton X-100. Posteriormente as células foram sonicadas, o *debris* celular removido por centrifugação e sobrenadante foi passado por cromatografia em coluna Ni²⁺ *chelating sepharose* (GE Biosciences Amersham) com tampão de equilíbrio (5 mM imidazol, 500 mM NaCl e 20 mM Tris-HCl pH 7.9). Após passagem do sobrenadante de cultura, a coluna foi lavada e as proteínas recombinantes foram eluídas com solução tampão de imidazol (250 mM imidazol, 500 mM NaCl e 20 mM Tris-HCl pH 7,9).

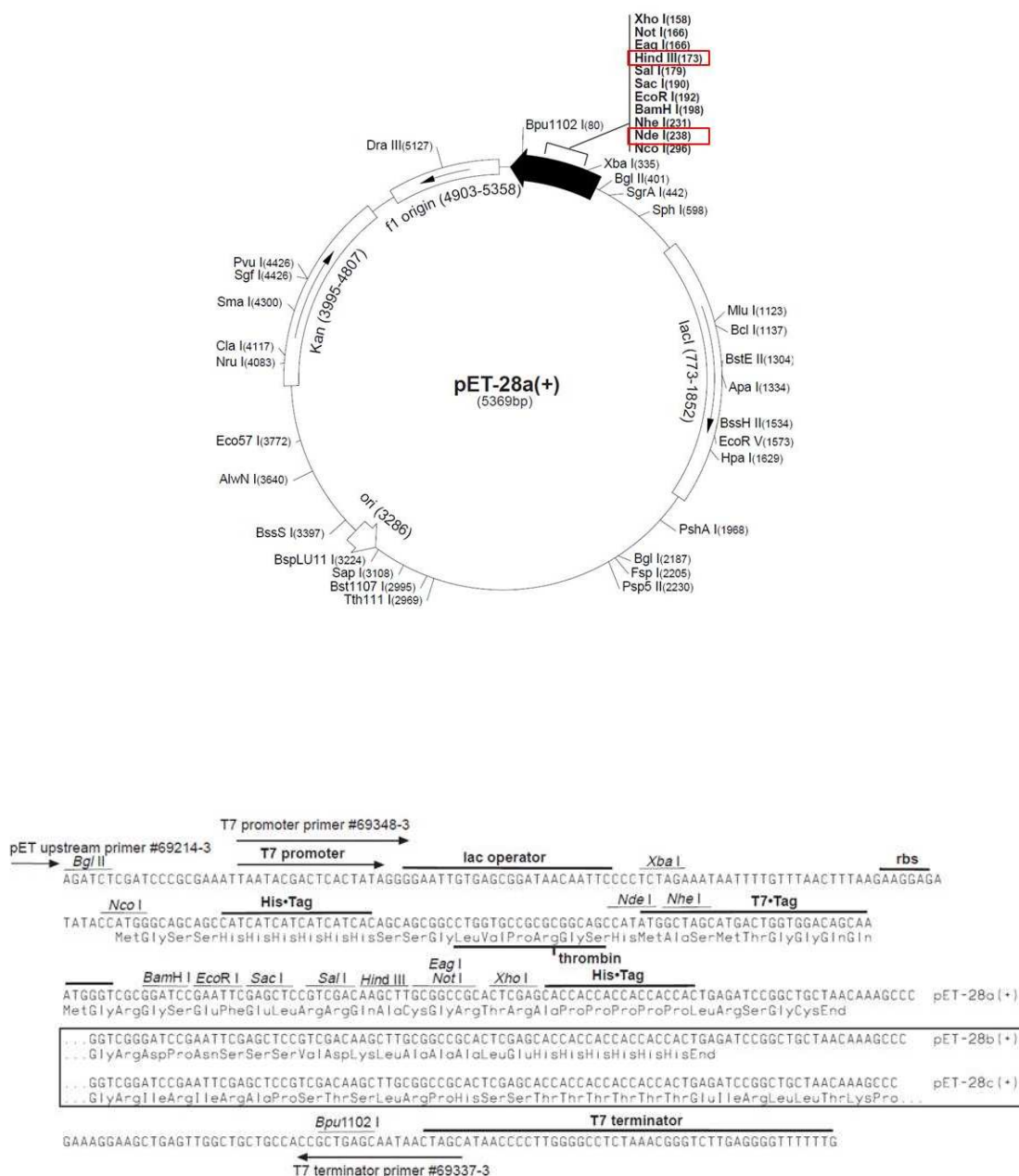


Figura 2. Mapa do plasmídeo pET28a utilizado para inserção dos fragmentos **SAG2A** e **SAG2A^{Δ135}** amplificados. O local de clivagem por enzimas de restrição e inserção dos fragmentos amplificados foram evidenciados com caixa vermelha (Novagen)

O pool das frações contendo as proteínas recombinantes foi dialisado em PBS e passadas em cromatografia em coluna Sephadex G75 (1 x 50 cm) previamente equilibrada com 10 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,5 M NaCl. As cromatografias foram realizadas sob fluxo contínuo de 3,5 mL/min com frações de 500 µl coletadas tendo sua DO monitoradas a 280 nm. As frações com as proteínas recombinantes correspondente foram concentradas e ultrafiltradas em sistema Amicon (Millipore, Billerica, MA, USA) tendo posteriormente sua concentração determinada pelo Ácido Bicínico (BCA, Sigma-Aldrich) e a presença de endotoxina pelo método modificado *Limulus amebocyte* lysate assay (LAL, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA).

3.6. Análise de bioinformática

Mapeamento da proteína e busca por sequências homólogas foram realizados utilizando bancos de dados online: Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Prot (<http://ca.expasy.org/>); EuPathDB (<http://eupathdb.org/>); ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>); pesquisa de *motifs* da proteína SAG2A foram realizadas no banco de dados online MyHits (<http://myhits.isb--sib.ch>).

3.7. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Os antígenos de *T. gondii* foram avaliados em sistema unidimensional utilizando tampão descontínuo como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970) e sistema de placas de vidro descrito por Studier (STUDIER, 1973). Os géis de poliacrilamida nas concentrações de 12% foram montados em placas do sistema de eletroforese SE250 (Amersham-Pharmacia Biothec, UK) de dimensões 8 x 10 x 0,075 cm. Antígenos de *T. gondii* foram submetidos a 95 °C por 5 minutos e aplicadas ao gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram eletroforéticamente separadas utilizando uma corrente de 20 mA. Após a corrida, os géis foram corados com solução de coomassie (Coomassie brilliant blue R-250 dissolvido em metanol 50% e ácido acético 10%) e mantidos em ácido acético 7% até a digitalização das imagens. Adicionalmente, para melhor visualização do perfil eletroforético de algumas amostras, realizou-se a coloração por prata. Assim, após corrida eletroforética, géis foram adicionados em solução fixadora (60 mL ácido acético, 250 mL metanol, 250 µl de formaldeído, q.s.p. 500

mL H₂O) por 18 horas a temperatura ambiente. Após processo de fixação, os géis foram desidratados em solução etanol 50% seguido de pré-tratamento em tiosulfato de sódio sob agitação. Posteriormente os géis foram incubados com solução de nitrato de prata (Nitrato de Prata 0,1 g, 50 µl de formaldeído, q.s.p. 50ml) por 20 minutos em câmara escura seguido de revelação com solução reveladora (Carbonato de Sódio 3 g; 25 µl de formaldeído; tiosulfato de sódio, H₂O 50 ml).

3.8. Immunoblotting e Slot-Blot

Os antígenos separados em SDS-PAGE foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como descrito por TOWBIN et al, 1979. Para o immunoblotting, membranas de SDS-PAGE cortadas em tiras de 3-4 mm foram bloqueadas com solução PBSTween suplementada com leite desnatado 5% durante 1 hora e a 37 °C. Terminado este tempo, as membranas foram incubadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas e soro policlonal de camundongo de interesse por período de 1 hora a 37 °C. Para realização do *Slot-Blot* membranas de nitrocelulose foram preparadas com STAg, taquizóitos da cepa Me49 e RH vivos e inativados por calor em diluição decimal seriada a partir de 100 µg/ml . Membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em PBS-Tween (PBS-TM) e incubadas com mAb A4D12 overnight a 4 °C. Para detecção da ligação dos anticorpos aos antígenos imobilizados em nitrocelulose no *Immunoblotting* e *Slot-Blot*, realizou-se subsequente incubação das membranas com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongos conjugado à peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co.). Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas em PBST e reveladas por meio da adição de substrato enzimático (H₂O₂) e cromógeno em tabletes de 3, 3'diaminobenzidina (Sigma FastTM; Sigma Chemical Co.) como descrito pelo fabricante.

3.9. Diferenciação de células derivadas da medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) foram gerados a partir de células tronco de medula óssea como previamente descrito por ZAMBONI e RABINOVITCH, 2003. As células tronco provenientes de camundongos foram cultivadas em placas de petri plásticas não tratadas para aderência (BD Biosciences, EUA) de 10 cm por sete dias em meio RPMI 1640 contendo 15 mM de HEPES, 2g de bicarbonato de sódio/litro, 1 mM

de L-glutamina e suplementado com 20% de soro fetal bovino e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM). MΦ foram removidos da superfície das placas sob gelo por pipetagem vigorosa com PBS. As células foram contadas e adicionadas (2×10^5) em placas de cultura de 96 poços.

Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foram geradas como previamente descrito em MINEO et al, *in press*. Células tronco de medula foram cultivadas (7×10^5 células/poço) em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e 20 ng/ml de fator estimulador de colônia granulócito macrófago (GM-CSF) murina. Diariamente os sobrenadantes foram gentilmente removidos e substituídos com igual volume de meio suplementado. No sexto dia de cultura, células não aderentes foram removidas e plaqueadas em placas de cultura anterior à estimulação.

3.10. Tratamento de células e parasitos

Para análise de modulação da atividade imune celular, mediante tratamento com proteína SAG2A recombinante, MΦ foram ativados com LPS e IFN-γ por 48 horas e BMDCs com LPS ou Pam3 por 24 horas *in vitro*. Após estimulação, dosagem da produção de NO por MΦ e IL-12p40 por BMDCs foram monitorados conforme descrito posteriormente. Com objetivo de verificar o efeito modulatório de *T. gondii*, BMDCs e MΦ foram infectados com parasito da cepa RH e Me49 sob diferentes MOI (*multiplicity of infection*) e STAg em diferentes concentrações. O efeito do reconhecimento antigênico em parasitos e STAg pelo mAb A4D12 foi monitorado através da dosagem de produção de NO por MΦ e IL-12 por BMDCs conforme descrito abaixo.

3.11. Detecção de atividade anti-IL-6 de *Toxoplasma gondii*

Com o objetivo de quantificar a afinidade de taquizoítos de *T. gondii* por IL-6, realizou-se protocolo de inibição como previamente descrito por VANCOVÁ et al, 2007. Em cada ensaio, 50 pg de citocina recombinante em PBS suplementado com 1% soroalbumina bovina (BSA) foram misturado com concentrações crescentes de taquizoítos de *T. gondii* cepa RH com volume total de 100 µl/poço em microplacas de 96

poços. Como controle células foram plaqueadas com unicamente diluente da amostra. Cada mistura foi incubada por 1,5 hora a temperatura ambiente sob gentil agitação, seguindo de aplicação do sobrenadante em placa de ELISA (100 µl/poço em duplicatas). A quantificação das amostras foi obtida por comparação das absorbâncias com curva padrão linear para kit de ELISA. Detectáveis níveis de redução da citocina em questão, quando comparado com o controle, foram interpretados como evidencia pontual de atividade de ligação à citocina.

3.12. Quantificação de citocinas por ELISA

A concentração de IL-12p40 e IL-10 em sobrenadante de cultura de células, como para ensaio de inibição de IL-6, foram mensurados por kit ELISA comercial (BD PharMingen, San Diego, EUA; R&D Systems, Minneapolis, EUA). Os ensaios foram efetuados em comum acordo as instruções do fabricante. As reações foram reveladas com estreptoavidina conjugada com peroxidase, seguindo de adição do substrato peróxido de hidrogênio e do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) (BioRad, Hercules, CA, USA). As absorbâncias foram mensuradas em leitor de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 450 nm. A concentração de citocinas foi calculada por curva padrão de citocina recombinante murina. O limite de detecção para os diferentes ensaios realizados foi 31,3 pg/ml.

3.13. Quantificação da produção de Óxido Nítrico (NO)

Produção de óxido nítrico foi estimada por concentração de nitrito em sobrenadantes de cultura de MΦ, pelo método colorimétrico de Griess. Reagentes de Griess (sulfanilamida 1 % e alfa-naftil-etilenodiamina 0.1%) foram adicionados a 50 µl dos diferentes sobrenadantes de cultura de MΦ, na razão 1:1. Absorbâncias foram mensuradas a 540 nm. A concentração de NO foi determinada usando curva padrão estabelecida com 200 µM de nitrito de sódio, como ponto inicial. O limite de sensibilidade foi de 1,563 µM.

3.14. Análises estatísticas

Two-Way ANOVA seguido por análise posterior pelo método de Bonferroni foram utilizados para comparar grupos em relação a NO, IL-12p40 e produção de IL-10. Em

todas mensurações, diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados por três vezes executados em diferentes dias. A análise estatística dos dados obtidos foram efetuados através da utilização de GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem, purificação e expressão da proteína SAG2A recombinante

Com o objetivo de entender o papel da proteína de superfície SAG2A, fragmentos de DNA foram amplificados e clonados em *E. coli* Rosetta cepa DE3. Os produtos amplificados de SAG2 e SAG2^{Δ135} foram digeridos com as enzimas de restrição e inseridos em vetores embebidos entre domínios de cauda de Histidina. Os clones obtidos da transformação bacteriana foram confirmados a partir de PCR das colônias competentes, utilizando os respectivos *primers* de amplificação dos segmentos gênicos (Figura 3).

A expressão das proteínas foi realizada mediante indução com IPTG e o perfil de indução (Figura 4) e purificação por cromatografia de afinidade foram detectadas na fração solúvel do extrato bacteriano, conforme análise em SDS-PAGE (Figura 5). Devido as frações purificadas provenientes da fração solúvel bacteriana apresentarem presença de contaminantes de alto peso, as frações obtidas na purificação foram agrupadas e aplicadas em coluna Sephadex G75 sendo obtida proteína com alto grau de purificação (Figura 6).

Após o processo de purificação da proteína SAG2A, a proteína recombinante foi submetida à corrida de eletroforese (SDS-PAGE) e eletrotransferência à membrana de nitrocelulose para comprovação da funcionalidade imunogênica da proteína recombinante por *Immunoblot*. A proteína recombinante purificada apresentou características imunodominantes semelhantes à SAG2A descrita na literatura. O anticorpo monoclonal A4D12 foi obtido em purificação em coluna G-sepharose como evidenciado através da Figura 7. Como pode ser observado na Figura 8, a proteína SAG2A recombinante foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal A4D12, específico para SAG2A e por anticorpo policlonal positivo para *Toxoplasma gondii*. A especificidade da molécula também pôde ser observada pelo não reconhecimento da proteína recombinante pelo anticorpo monoclonal A3A4, específico para p30 de *Toxoplasma gondii*.

Adicionalmente, nós verificamos a presença da proteína SAG2A em cepas RH e Me49 de *T. gondii* por *Slot blot*. Como visto na Figura 9, a proteína SAG2A foi igualmente observado em taquizoítos vivos e inativados por calor. Contudo, em STAg provenientes

da cepa RH observou-se maior detecção de SAG2A em amostras diluídas (0,01 µg) sugerindo sua presença em maior quantidade nesta cepa quando comparado com a cepa Me49.

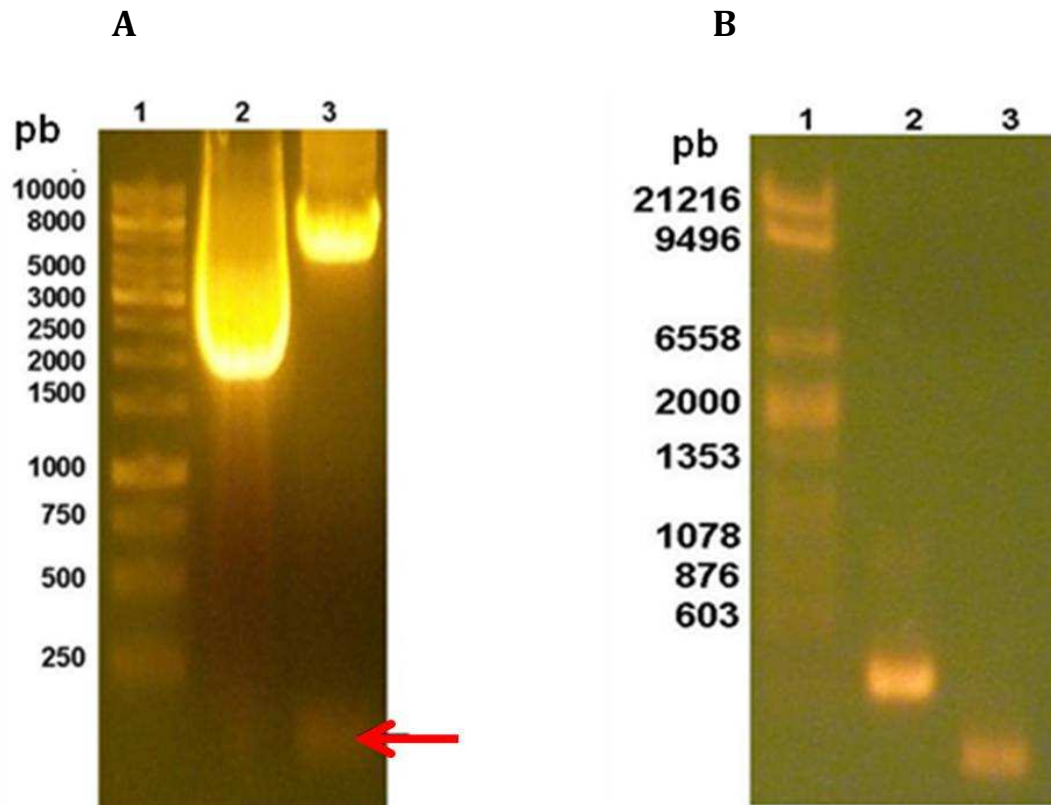


Figura 3. Clivagem do Vetor pET28a e amplificação dos fragmentos das proteínas **SAG2A** e **SAG2A Δ 135**. (A) Raia 1: Marcador de peso molecular de 1kb; Raia 2: PET28A inteiro; Raia 3: PET28A clivado com enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*. O fragmento do PET28A clivado é indicado pela seta. (B) Raia 1: Padrão *Lambda DNA EcoRI HindIII* (GenScript, USA). Segmentos gênicos amplificados da SAG2A (Raia 2) e SAG2A Δ 135 (Raia 3) e clivagem do vetor pET28a foram visualizadas em gel de agarose 1%.

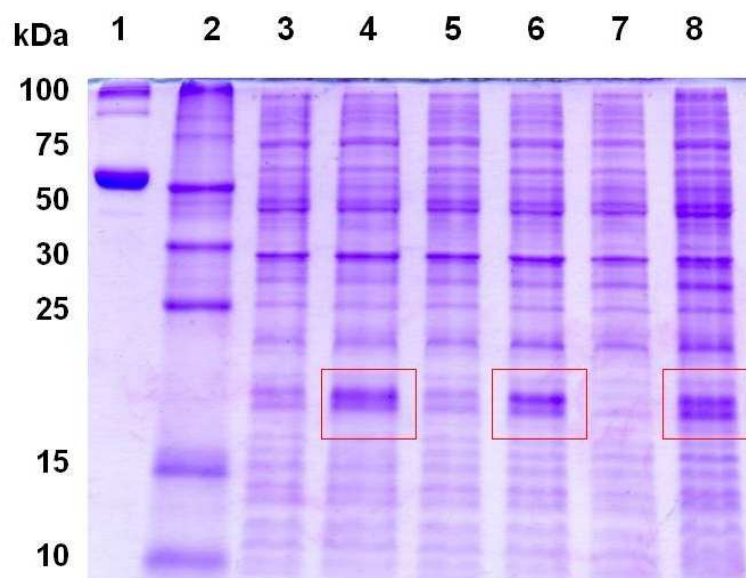


Figura 4. **Perfil de indução de diferentes clones de Bactérias expressando as proteínas SAG2A recombinantes em meio LB.** Raia 1: Soro Albumina Bovina; Raia 2: Padrão de peso molecular (10-225 kDa); Raias 3, 5 e 7: Perfil de proteínas bacterianas antes da indução com IPTG; Raias 4, 6 e 8: Perfil de proteínas das mesmas bactérias após indução com IPTG com a banda da proteína SAG2A expressa sendo evidenciado na figura proveniente de gel SDS-PAGE 12%.

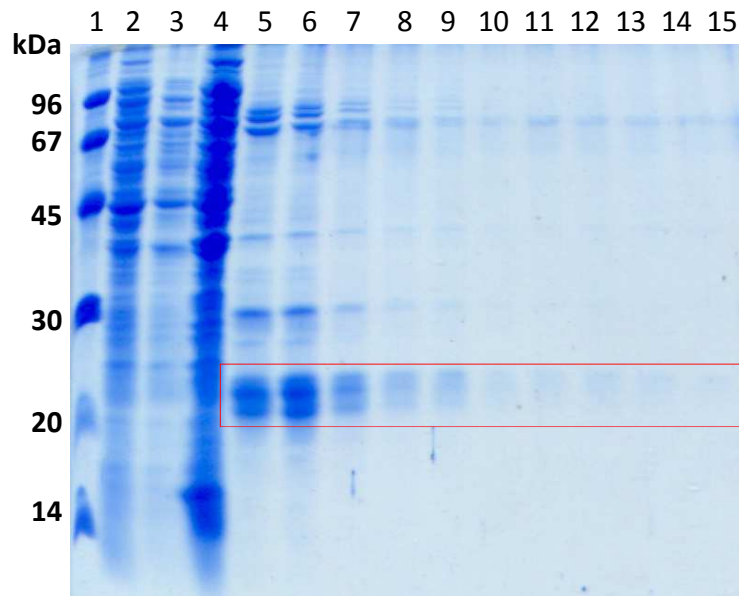
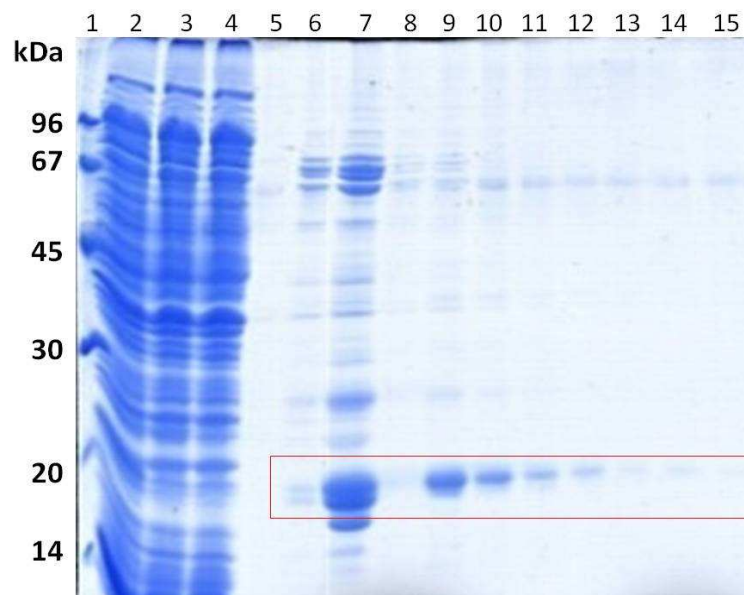
A**B**

Figura 5. Perfil de frações obtidas da purificação da proteína SAG2A e SAG2A Δ 135 em coluna com resina Chellating-Sepharose fast flow. **(A)** Purificação da proteína recombinante SAG2A - Raia 1: Padrão de peso molecular; Raia 2-3: *VOID*; Raia 4: amostra aplicada na coluna para purificação da proteína recombinante; Raia 5-15: Amostras representativas das frações de 1,5 ml obtidas da eluição da coluna de afinidade; **(B)** Purificação da proteína recombinante SAG2A Δ 135 - Raia 1: Padrão de peso molecular; Raia 2: amostra aplicada na coluna para purificação da proteína recombinante Raia 3-4: *VOID*; Raia 5-15: Amostras representativas das frações de 1,5 ml obtidas da eluição da coluna de afinidade. As proteínas SAG2A (1A) e SAG2A Δ 135 (1B) estão evidenciadas nas figuras provenientes de gel SDS-PAGE de 12% com caixas vermelhas.

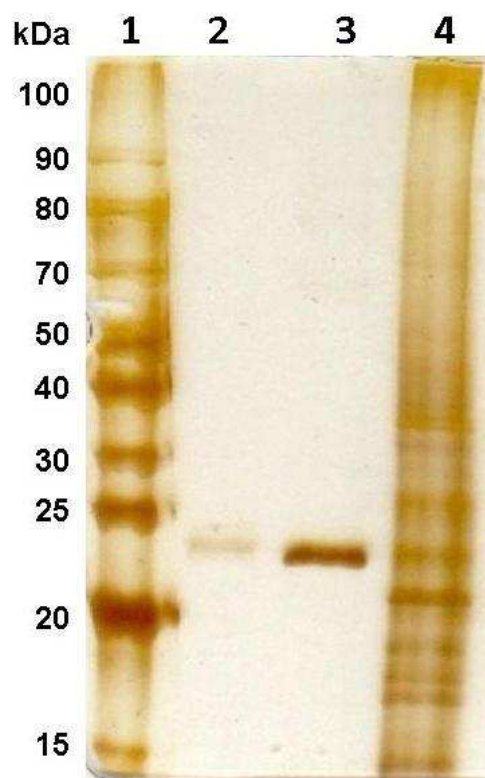


Figura 6. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% da proteína recombinante **SAG2A** após gel filtração. Raia 1: Padrão de peso molecular (BenchMark, invitrogen); Raia 2: Proteína rSAG2A; Raia 3: Proteína rSAG2A^{Δ135} ; Raia 4: Antígeno Solúvel de *T. gondii* (STAGRH).

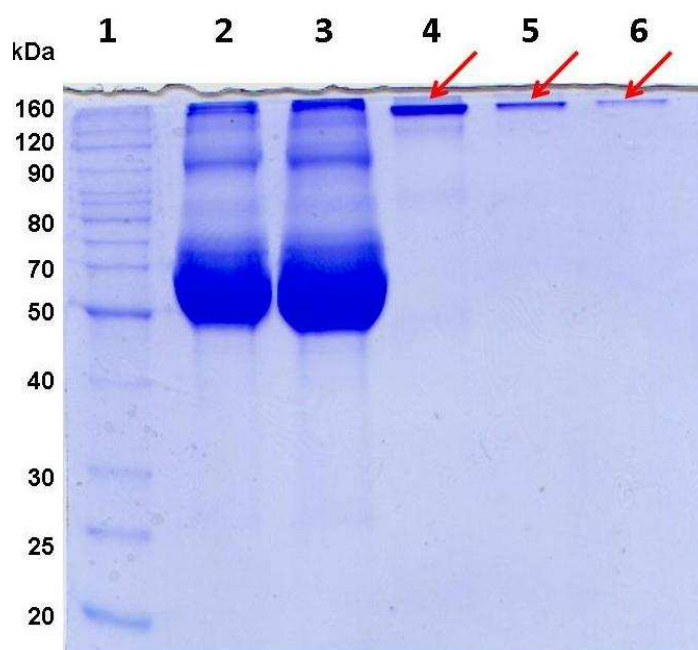


Figura 7. **Perfil eletroforético das frações provenientes de purificação do anticorpo monoclonal A4D12.** Raia 1: Padrão de peso molecular (BenchMark, invitrogen); Raia 2: Fração correspondente ao sobrenadante de cultura aplicado na coluna G-sepharose; Raia 3: Fração representante do *VOID* da purificação; Raia 4-6: Frações correspondente ao eluído da coluna. A presença do anticorpo monoclonal A4D12 é evidenciada na figura proveniente de gel SDS-PAGE de 12% através da seta vermelha.

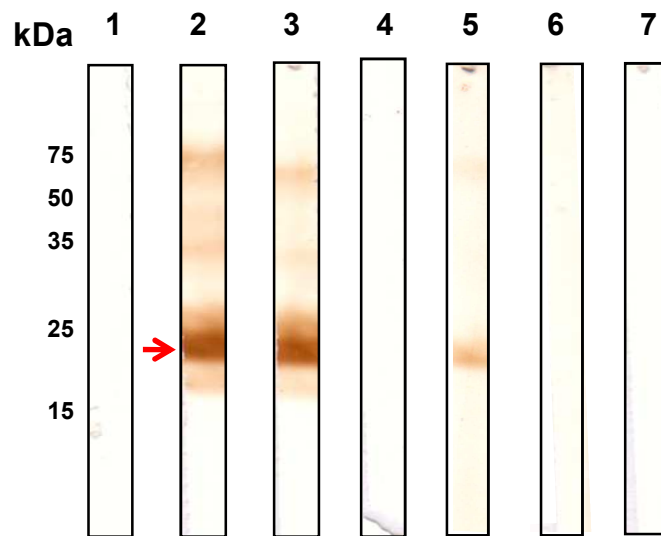


Figura 8. **Identificação de SAG2A por *immunoblotting* em fração da proteína recombinante purificadas sondados com os mAbs A3A4 e A4D12 e soro policlonal.** 1: mAb A3A4; 2 e 3: mAb A4D12; 4: Meio de cultura RPMI utilizado na cultura dos hibridomas de monoclonais; 5: Soro de camundongo policlonal positivo para *T. gondii*; 6: Soro de camundongo policlonal negativo para *T. gondii*; 7: Controle negativo do conjugado anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Proteína SAG2A é evidenciada como marcado pela seta vermelha.

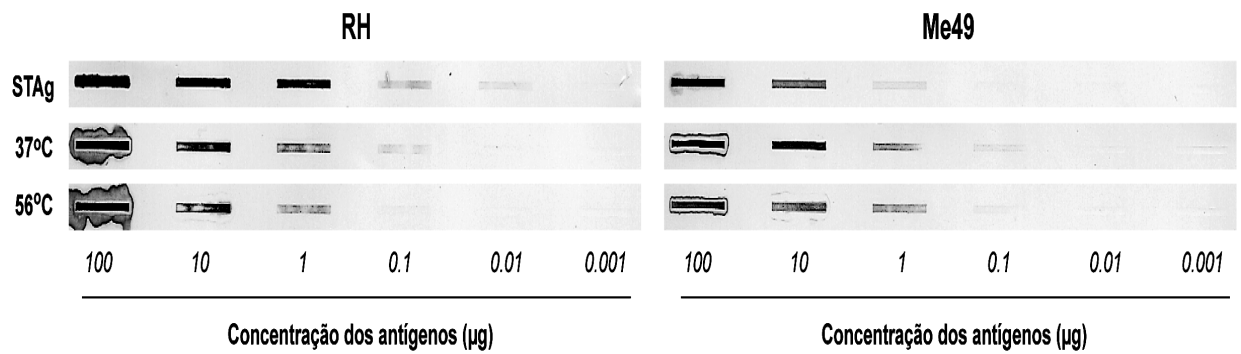


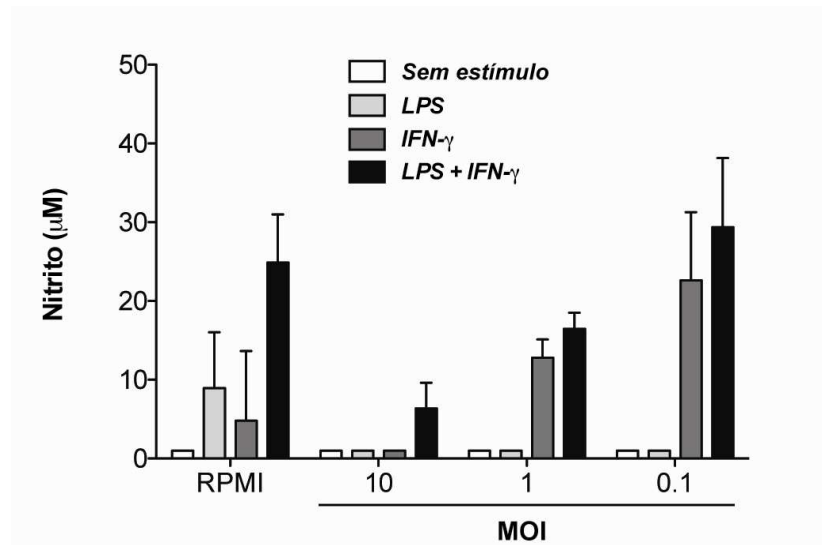
Figura 9. Reconhecimento da SAG2A em *slot blot* por anticorpo monoclonal A4D12 em diferentes preparações de *Toxoplasma gondii*. Concentração decrescente de antígeno solúvel de taquizoíto (STAg), taquizoítos vivos (37 °C) e inativados por calor (56 °C) de cepas RH e Me49 foram utilizadas para confecção da membrana.

4.2. Infecção por *T. gondii* regula a resposta de macrófagos e células dendríticas

Com o objetivo de se verificar a intensidade da modulação da resposta imune induzida por *T. gondii* *in vitro*, utilizou-se como modelo experimental cultura de MΦ e BMDCs ativadas. Como observado para macrófagos (Figura 10A), a produção de óxido nítrico após ativação com IFN- γ e LPS foi modulada negativamente de forma dose dependente quando as células foram pré-tratadas com parasitos vivos da cepa RH. A produção de IL-12 foi parcialmente modulada em BMDCs ativados por LPS (Figura 10B).

Com a intenção de se descartar a possibilidade dos mecanismos de supressão observados estivessem relacionados unicamente à indução de genes ligados ao LPS, BMDCs foram submetidas a estimulação com Pam3, agonista de TLR2, a qual confirmou o perfil de diminuição da produção de IL-12 em células infectadas com taquizoítos vivos, se comparado a células não infectadas (Figura 11). Adicionalmente, com o intuito de avaliar se os efeitos de modulação observados em MΦ e BMDCs foram dependentes da interação de parasitos vivos com as células do hospedeiro, foram utilizados de forma pareada taquizoítos vivos, inativados por calor e STAgRH. O experimento revelou que independentemente da natureza dos antígenos utilizados, foi observado um perfil similar de supressão para produção de NO por MΦ (Figura 12A) e IL-12 por BMDCs (Figura 12B).

A



B

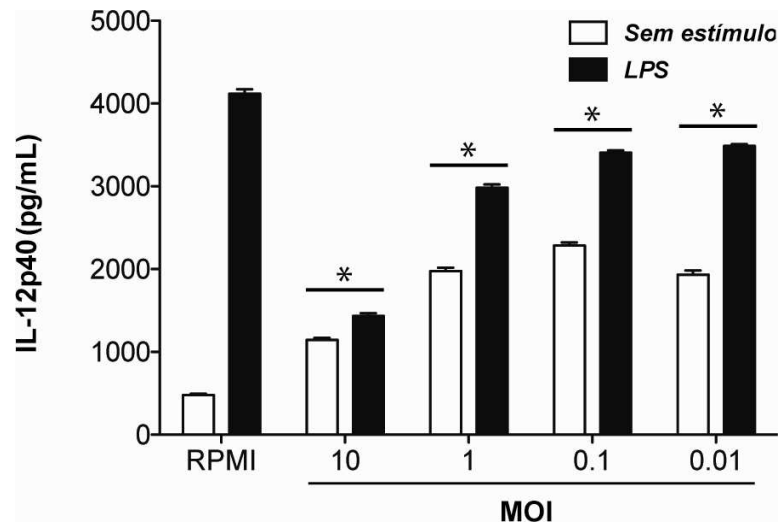


Figura 10. **Infecção por *Toxoplasma gondii* modula a resposta de macrófagos e células dendríticas.** (A) macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) foram pré-incubados com *T. gondii* sob diferentes razões de parasito:célula (*multiplicity of infection* – MOI) por 24 horas e estimulados com LPS (10 ng/ml), IFN-γ (100 ng/ml), LPS + IFN-γ ou sem tratamento por mais 48 horas. (B) Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) pré-incubados com *T. gondii* sob diferentes MOI por 24 horas foram estimuladas com LPS (1 µg/ml). Resultados foram apresentados em média ± SEM. * indica relevância estatística (p<0,05) em relação ao controle não-infectado.

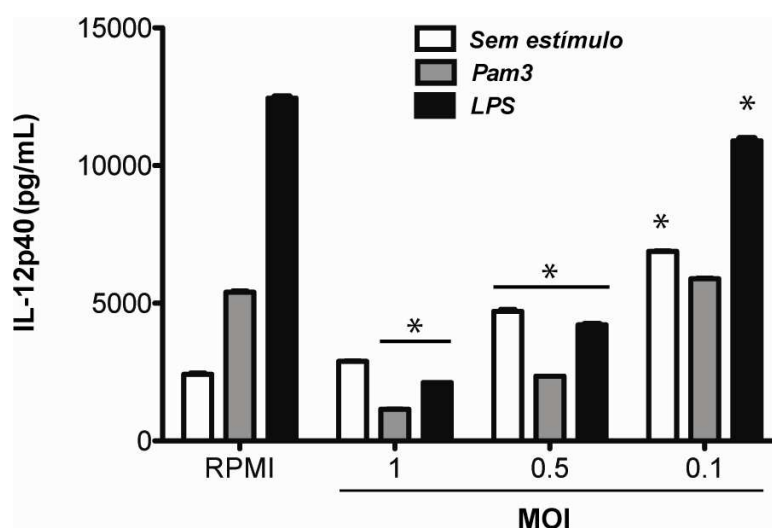
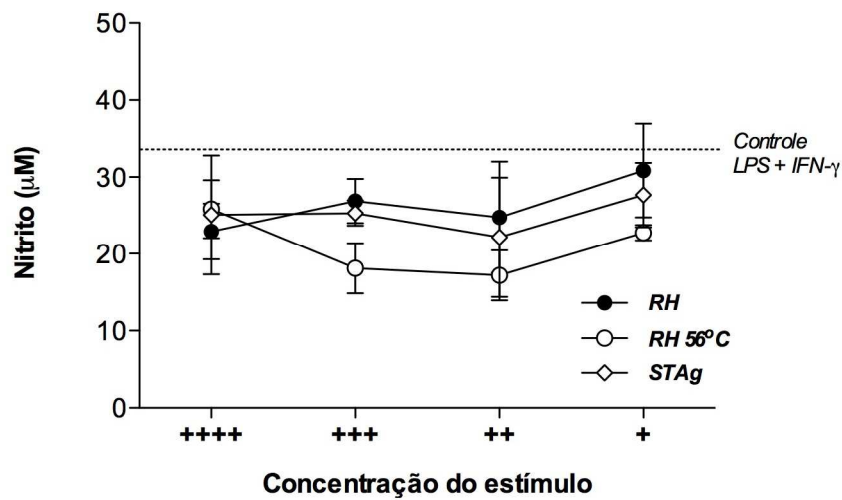


Figura 11. **Mecanismo de supressão de BMDCs por *Toxoplasma gondii* é independente de TLR4.** Pré-tratamento de BMDCs com diferentes MOI foram incubadas com LPS (agonista de TLR4 - 1 µg/ml) e Pam3 (agonista de TLR2 - 1 µg/ml) por mais 48 horas. Resultados foram apresentados em média ± SEM. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle não-infectado.

A



B

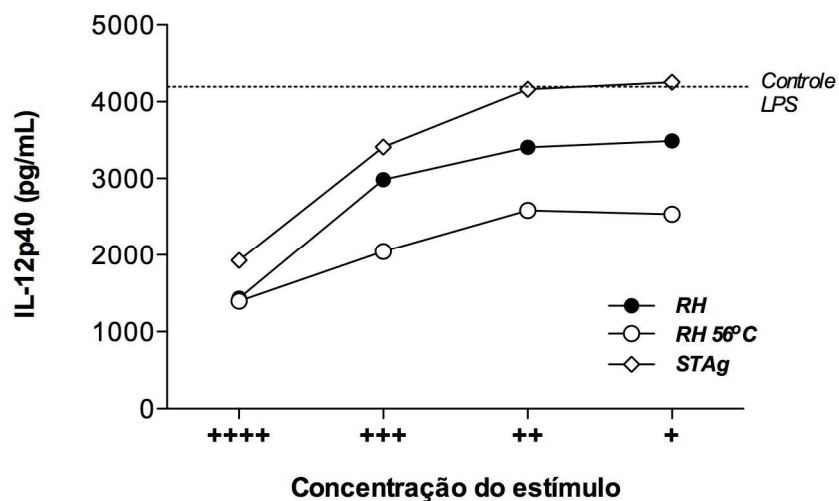
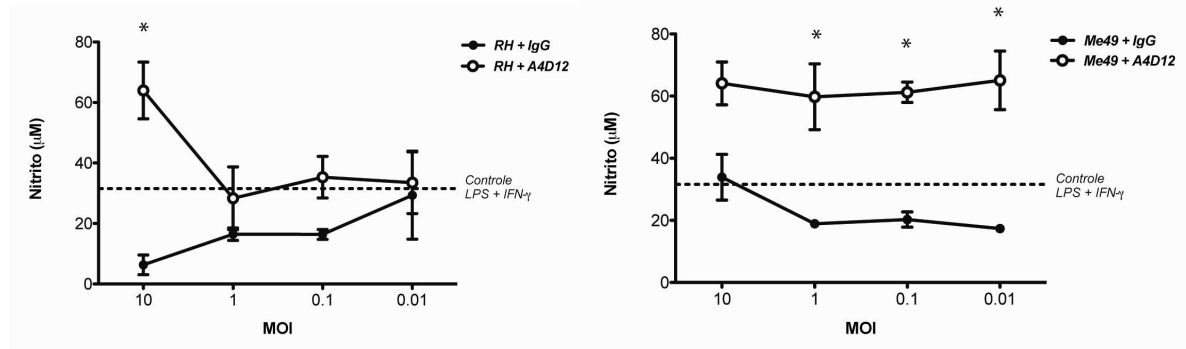


Figura 12. Efeito de inibição do *Toxoplasma gondii* não requer interação de parasito vivos com células do sistema imune inato. (A) Concentração de nitrito em macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) estimulados com LPS (10 ng/ml) e IFN-γ (100 ng/ml) por 48 horas; (B) A produção de IL-12p40 por células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) estimuladas com LPS (1 µg/ml) por 24 horas. Anterior a ativação, células foram pré-tratadas por 24 horas com taquizoítos vivos (RH) ou inativados por calor (RH 56 °C) (++++ = multiplicity of infection – MOI 10; +++ = MOI 1; ++ MOI 0,1; + = MOI = 0,01) ou antígeno solúvel de taquizoíto (STAg - ++++ = 100 µg/ml; +++ = 10 µg/ml; ++ = 1 µg/ml; + = 0,1 µg/ml). Linha pontilhada indica a média de valores obtidas por MΦ e BMDCs sem tratamento. Resultados foram apresentados por média ± SEM.

Estudos anteriores identificaram um anticorpo monoclonal (mAb A4D12) capaz de reconhecer um epítipo imunodominante contido na região C-terminal da proteína de superfície SAG2A (CUNHA-JÚNIOR et al, 2010). Assim, experimentos foram realizados para checar se o epítipo imunodominante possui papel na modulação negativa da imunidade inata observada em ensaios anteriores, utilizando o bloqueio de taquizoítos da cepa RH e Me49 com o mAb A4D12. Como mostrado na Figura 13, o pré-tratamento dos parasitas com mAb A4D12 resultou em maior produção de NO por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ (Figura 13A) e IL-12 por BMDCs não estimuladas (Figura 13B). Adicionalmente, observou-se que o efeito modulatório foi distinto entre as cepas do parasito analisadas, sendo que o anticorpo monoclonal fortemente reverteu a modulação negativa promovida pelo Me49, enquanto o mesmo fenômeno foi de menor intensidade para taquizoítos da cepa RH. Para uma melhor avaliação das diferenças de modulação entre cepas RH e Me49 de *T. gondii*, ensaios comparativos foram realizados entre ambas cepas. Observou-se que o pré-tratamento das diferentes linhagens celulares com parasitas da cepa RH induziu forte efeito supressor para produção de NO por M Φ ativados por LPS e IFN- γ (Figura 14A) e síntese de IL-12 por BMDCs estimuladas por LPS (Figura 14B).

A



B

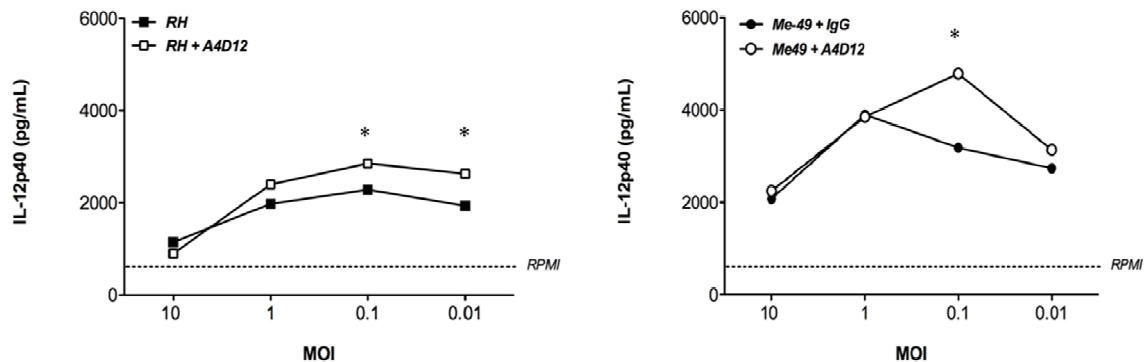
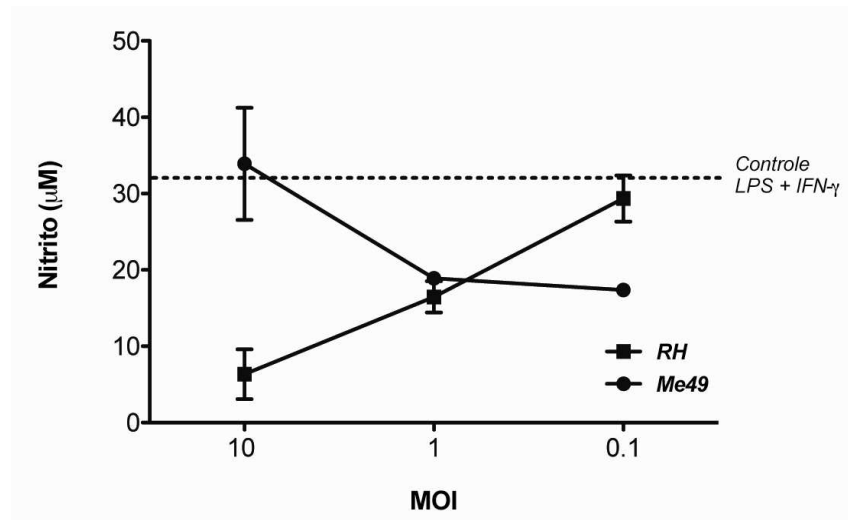


Figura 13. O bloqueio do epítipo imunodominante da proteína SAG2A por mAb A4D12 reverte parcialmente a modulação negativa de células do sistema imune inato induzidas por *Toxoplasma gondii*. (A) macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) e (B) Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foram pré-tratadas com *T. gondii* sob diferentes razões de parasito:célula (*multiplicity of infection* – MOI) com taquizóitos das cepas RH e Me49 na presença do anticorpo monoclonal A4D12 ou IgG irrelevante por 24 horas. Antes da determinação de nitrito e dos níveis de IL-12p40 a ativação celular foi promovida por LPS (10 ng/ml) e IFN-γ (100 ng/ml) em MΦ (48 horas) e LPS (1 µg/ml) em BMDCs. Resultados foram apresentados em média ± SEM. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle não-infectado.

A



B

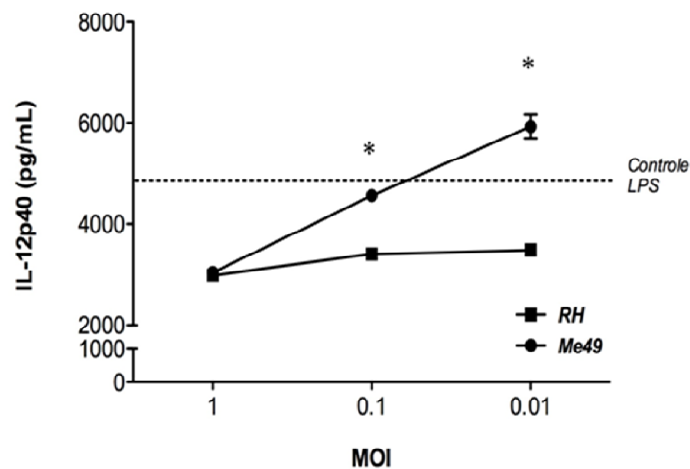


Figura 14. **Supressão de células do sistema imune inato por SAG2A é dose dependente.** (A) Macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) e (B) Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foram pré-tratados com diferentes proporções de parasito:célula (*multiplicity of infection* – MOI) com taquizoítos das cepas RH e Me49 e ativadas com LPS (10 ng/ml) e IFN- γ (MΦ, 100 ng/ml, 48 horas) e LPS (BMDCs, 1 μ g/ml, 24 horas), antes da determinação dos níveis de nitrito e IL-12p40. Linha pontilhada indica a média de valores obtidas por MΦ e BMDCs sem tratamento. Resultados foram apresentados por média $\pm$ SEM. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) entre cepas do parasito.

Para entender melhor o efeito do antígeno SAG2A sobre o sistema imune inato, ensaios utilizando pré-tratamento de células imunes com rSAG2A e rSAG2A^{Δ135} foram realizados. O pré-tratamento de MΦ e BMDCs com rSAG2A e rSAG2A^{Δ135} induzem padrões diferentes de ativação celular. Enquanto a proteína intacta induziu quase indetectáveis níveis de NO e IL-12, rSAG2A^{Δ135} apresentou um potente efeito pró-inflamatório em MΦ (Figura 15A) e BMDC (Figura 15B). Similar fenômeno foi observado em células ativadas, sendo que o pré-tratamento com rSAG2A^{Δ135} foi incapaz de suprimir posterior ativação por IFN-γ e LPS em MΦ ou LPS em BMDCs.

Ainda na busca por mais informações sobre as propriedades biológicas do antígeno SAG2A, *motifs* conservados na sequência da proteína foram analisados em modelos computacionais. Observou-se que a proteína possui sítios conservados de fosforilação dentro de sua sequência, sendo estas não restritas as regiões C- e N-terminal (Figura 16A). Análises mais detalhadas revelaram sítios de fosforilação para Caseína Kinase II (CK2), Monofosfato de Adenosina Cíclico (cAMP) e Proteína Kinase C (PKC) variando em diferentes locais da molécula (Figura 16B). Adicionalmente, foi encontrado uma sequência com elevada homologia para a cadeia-α do receptor de IL-6 humana, justamente no sítio de ligação da citocina (Figura 16C).

Para avaliar o significado biológico desses achados, avaliou-se experimentalmente a produção de IL-10 por macrófagos tratados com rSAG2A e rSAG2A^{Δ135} para observar se a proteína foi capaz de mimetizar o efeito descrito de aumento de cAMP intracelular durante a infecção por *T. gondii*. Foi encontrado que o tratamento das células com rSAG2A induziu alta produção de IL-10 em macrófagos, enquanto esse efeito não pode ser observado para rSAG2A^{Δ135}, o qual diminuiu a produção dessa citocina em altas concentrações (Figura 17).

As propriedades de ligação de IL-6 ao *T. gondii* foram avaliadas e nós podemos observar que o taquizoíto RH vivo mostrou-se capaz de ativamente inibir a detecção de IL-6 recombinante em cerca de 40%, independente da dose utilizada (Figura 18).

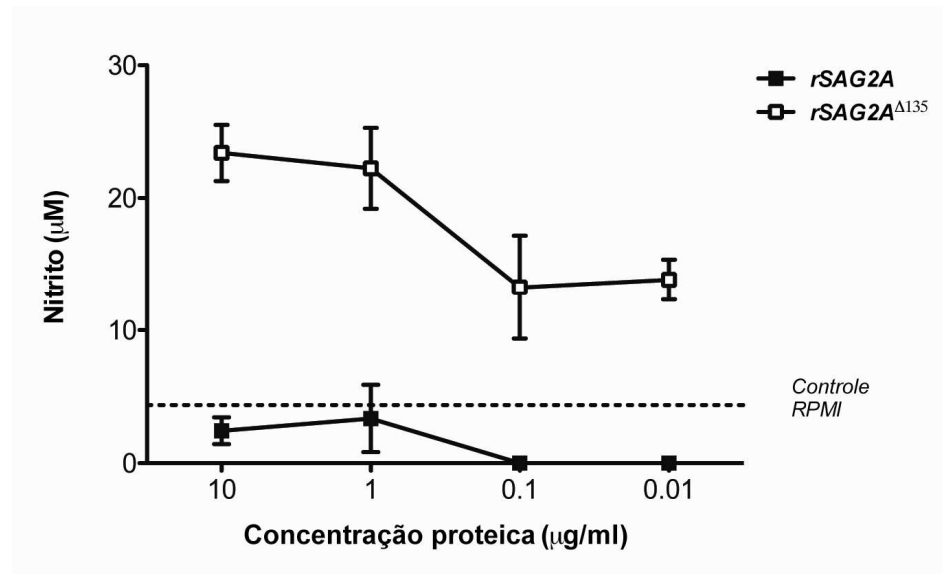
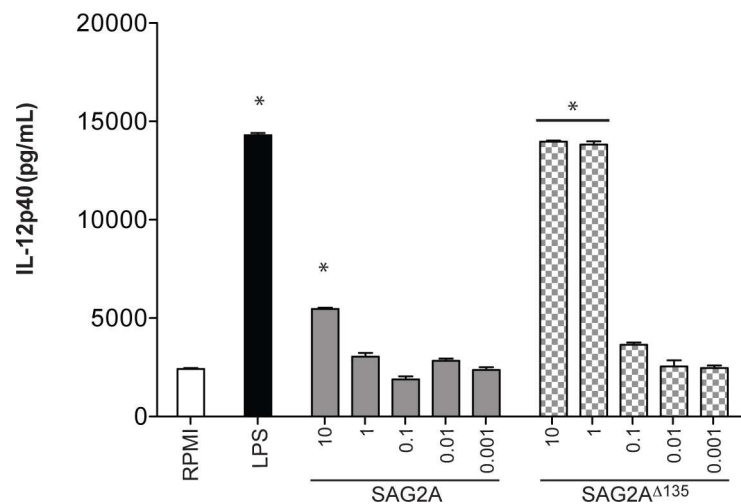
A**B**

Figura 15. Região C-terminal da proteína SAG2A tem potencial supressor da ativação imune inata induzida por essa proteína. (A) Macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) e (B) Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foram tratadas com concentrações decrescentes da SAG2A recombinante (rSAG2A) e a forma truncada da proteína sem a região C-terminal (rSAG2A^{Δ135}) por 48 horas anterior à determinação dos níveis de nitrito e IL-12p40. Como controle, células foram não tratadas ou foram expostas a LPS (1 µg/ml) por período semelhante às células pré-incubadas com as proteínas recombinantes. Resultados foram apresentados por média ± SEM. * indica relevância estatística (p<0,05) em relação ao controle não tratado.

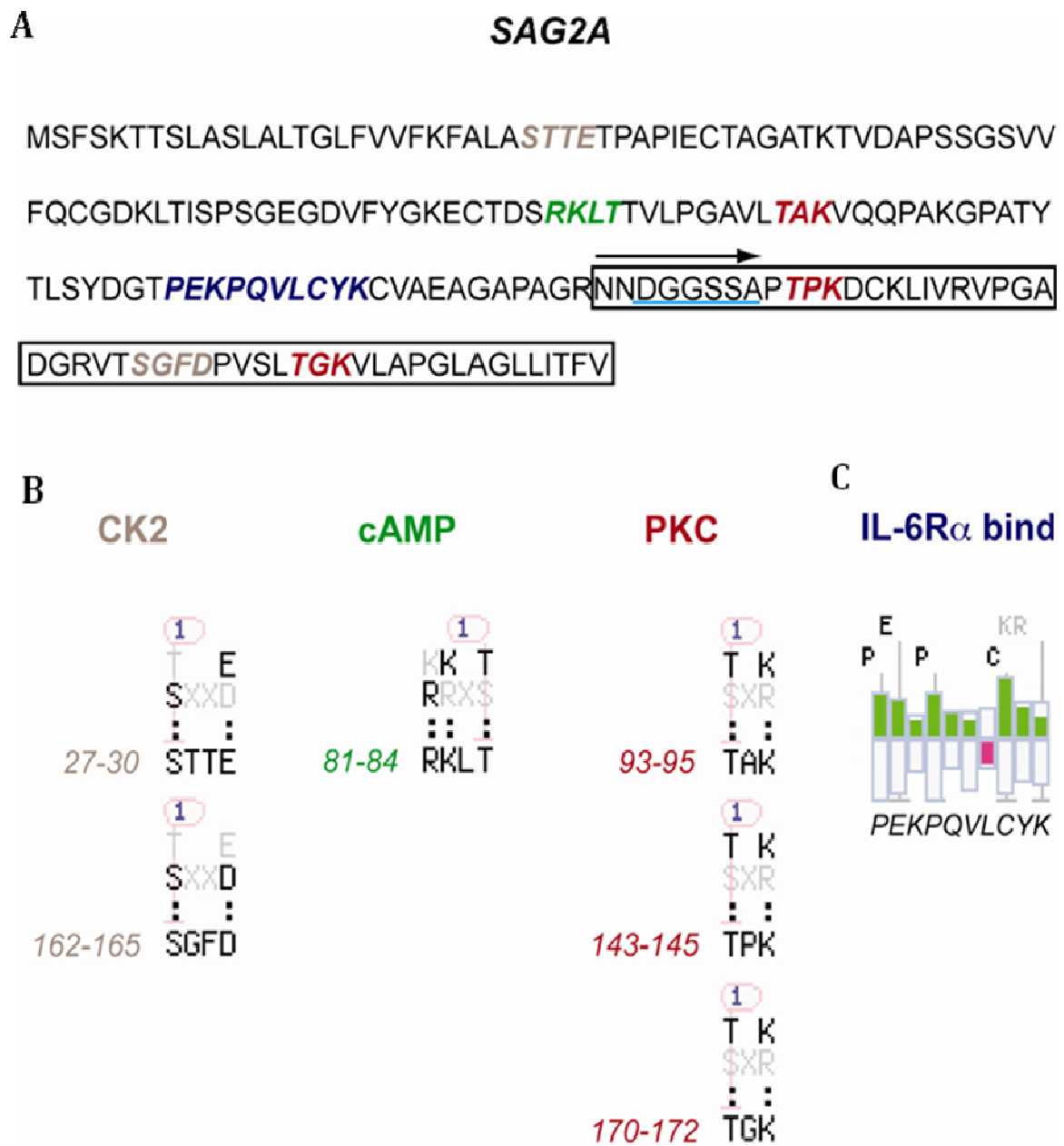


Figura 16. **Proteína SAG2A possui variados *motifs* ativos com potencial função modulatória da resposta imune inata.** (A) Sequência de aminoácidos da proteína SAG2A com uma representação dos sítios ativos encontrados por análise *in silico*: sítios para fosforilação por Caseína Kinase (CK2; marrom), Monofosfato de Adenosina Cíclico (cAMP; verde) e proteína Kinase C (PKC; vermelho). A região depleta na proteína SAG2A truncada (rSAG2A^{Δ135}) está indicado por caixa. O epítipo imunodominante da SAG2A está indicada por linha azul claro. (B) Sequências homólogas de motivos conservados encontrados dentro da molécula SAG2A em relação aos ortólogos humanos, com os respectivos aminoácidos localizados com a molécula do *T. gondii*. (C) Sítio de ligação, com elevada homologia de sequência com a cadeia- α do receptor de IL-6 humano (ligante à IL-6R α ; Azul escuro) foram encontrados com elevada homologia.

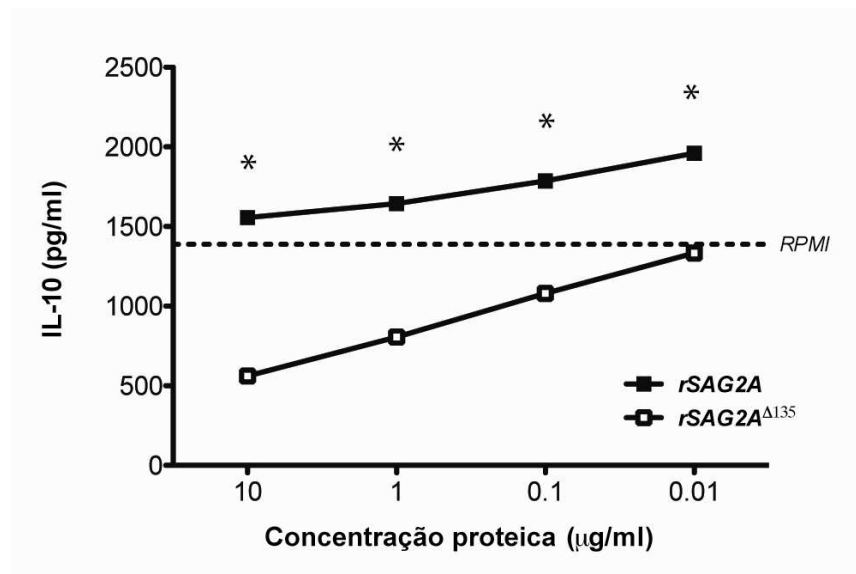


Figura 17. **Indução da produção de IL-10 por concentrações decrescentes das proteínas rSAG2A e rSAG2A^{Δ135} em macrófagos derivados de medula óssea (MΦ) após 48 horas.** Linha pontilhada indica a média de valores obtidas por MΦ sem tratamento. Resultados foram apresentados por média $\pm$ SEM. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle não tratado.

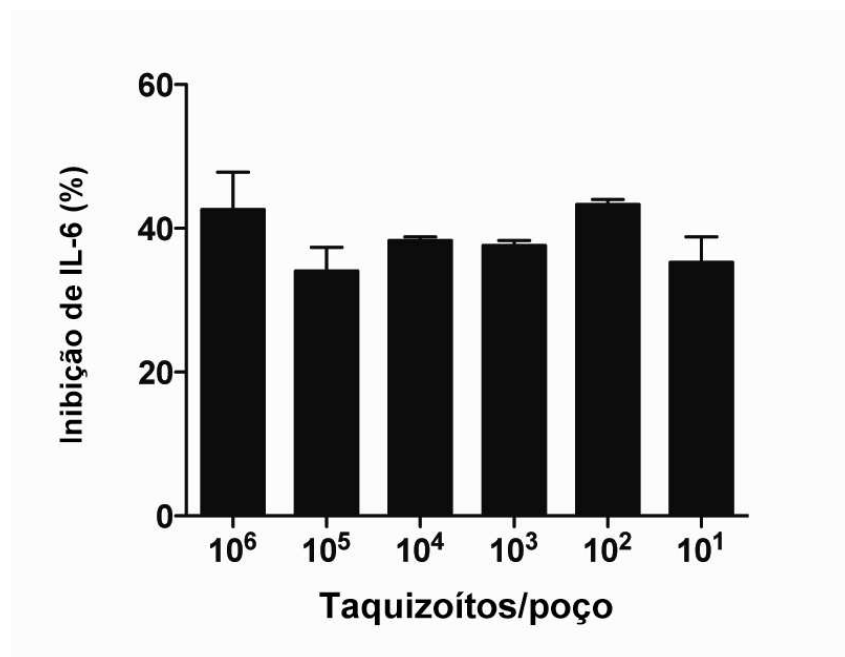


Figura 18. **Proteína SAG2A possui sítio semelhante ao local de ligação de IL-6 ao receptor de citocina.** Porcentagem da detecção de inibição da IL-6 recombinante (50 pg/poço) induzida por diferentes concentrações de taquizoítos vivos da cepa RH/poço analisado por ELISA de inibição.

5. DISCUSSÃO

A modulação negativa da resposta imune inata é um aspecto chave da infecção por *T. gondii*, sendo extensamente pesquisado nas ultimas décadas (MILLER et al, 2009; POLLARD, KNOLL e MORDUE, 2009). Este fenômeno foi confirmado nos modelos experimentais aqui descritos, onde a indução da produção de óxido nítrico e IL-12 em MΦ e DCs por estímulos conhecidos foram diminuídos após exposição ao parasito. Estudos recentes demonstram eficiente supressão da ativação celular induzida por LPS em células do sistema imune, embora a síntese de IL-12 seja iniciada por estímulo próprio de *T. gondii*, o parasito suprime a síntese de IL-12p40 e TNF- α ativada por LPS em células infectadas (LENG, BUTCHER e DENKERS, 2009; POLLARD, KNOLL e MORDUE, 2009). Neste sentido, foi demonstrado neste trabalho que a SAG2A possui um papel importante na modulação de MΦ e DCs na infecção por *T. gondii*. A necessidade fisiológica deste processo de regulação em resposta ao LPS e outros ligantes de TLR pode ser explicado pela necessidade do parasito evadir dos mecanismos microbicidas induzidos por moléculas como NO, GTPase e citocinas inflamatórias que podem ser altamente efetivos na eliminação parasitária (BUZONI-GATEL e WERTS, 2006). TLR4 é o receptor do tipo Toll mais expresso na superfície de macrófagos e DCs e a estimulação descontrolada do TLR4 pode gerar um quadro de imunopatologia intestinal, fato observado em camundongos C57BL/6 (BUZONI-GATEL e WERTS, 2006). O próprio parasito apresenta a expressão de ligantes de TLR11 (profilina), bem como TLR2 e TLR4 (HSP70 e âncoras de GPI, respectivamente) (BLADER e SAEIJ, 2009; SEIPEL et al, 2009). Estudos têm revelado que ativação de TLR11 por profilina induz a produção de IL-12 e IFN- γ , citocinas chaves para proteção do hospedeiro durante a toxoplasmose. A proteína do choque térmico 70 (HSP70) é um potente indutor de NO e proteínas com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pode induzir produção de TNF- α (MILLER et al, 2009; NISHIKAWA et al, 2007).

Os resultados aqui descritos demonstraram que o parasito vivo ou inativado, assim como o STAg, foram capazes de diminuir a produção de IL-12 e NO de modo similar. Contudo, estudos prévios indicaram que a invasão ativa e sobrevivência do parasito dentro do vacúolo parasitóforo são requeridos para induzir e manter os macrófagos não responsivos à ativação pelo LPS (BUTCHER e DENKERS, 2002). Essas

diferenças podem ter sido observadas por distintos períodos de estimulação e proporção parasito:célula.

Adicionalmente, foi observado que o perfil de resposta imune gerado apresenta diferenças significantes quanto a cepa de *T. gondii* analisada. Distinções genéticas encontradas entre cepas de *T. gondii* tem sido implicadas em diferenças na intensidade da patologia decorrente da infecção, bem como o potencial para a modulação de células imunes (SAEIJ, BOYLE e BOOTHROYD, 2005; TAYLOR et al, 2006). Disparidade entre cepas de *T. gondii* são geradas através de diferenças quantitativas na expressão de proteínas bem como pelo polimorfismo de aminoácidos (BOYLE et al, 2008). O polimorfismo presente na proteína secretada ROP16 entre cepas do tipo I e II revelou que a substituição de um único aminoácido em um domínio kinase determinou diferenciação na fosforilação de STAT3 (YAMAMOTO et al, 2009). Sabe-se que RH e Me49 apresentam proteínas polimórficas e expressão de diferentes genes, regulando distintamente a infecção em hospedeiro humano e murino (AJIOKA, FITZPATRICK e REITTER, 2001), como refletido nos resultados aqui apresentados. A melhor compreensão de cada uma dessas proteínas é um passo importante para desvendar as interações parasito-hospedeiro durante a toxoplasmose. A expressão de SRS2 e SRS3 parece ser limitada ao taquizóito, contudo parasitos da cepa RH apresentam menor expressão de SRS2 quando comparado com parasitos pertencentes a cepas do tipo II (Me49) e III (AJIOKA, FITZPATRICK e REITTER, 2001). Adicionalmente, vários estudos têm mostrado que a produção de anticorpos contra *T. gondii* é cepa específico (KONG et al, 2003). Polimorfismos no *locus* gênico responsável pela codificação de SAG2A varia entre 1 e 5%, sendo que anticorpos contra esta proteína possuem um caráter genótipo-específico, ainda que todas os três genótipos identificados de *T. gondii* expressem aproximadamente níveis iguais da proteína SAG2A (KONG et al, 2003). Esses dados sugerem que embora polimórfica, epítomos contidos dentro de SAG2A são altamente imunogênicos e imunodominantes (KONG et al, 2003).

A observação da modulação da resposta imune inata por proteína SAG2A, em particular região C-terminal, pode gerar um melhor entendimento para os mecanismos de modulação induzidos por *T. gondii*. SAG2A tem-se revelado como um antígeno imunodominante e um marcador de fase aguda para o diagnóstico da toxoplasmose humana (BÉLA et al, 2008). De forma similar, SAG1 é uma proteína imunodominante de *T. gondii* que apresenta intensa detecção em amostras de soro de indivíduos infectados,

além de apresentar uma potente ativação de células T, induzindo a produção de IFN- γ (BLADER e SAEIJ, 2009; KIM e BOOTHROYD, 2005). Não constam na literatura informações específicas sobre o potencial de ativação de células T por SAG2A, contudo uma proteína quimérica contendo SAG1 e SAG2A (rSAG1/2) foi capaz de ativar resposta imune protetora do tipo-Th1 e aumentar a sobrevivência em camundongos após desafio experimental por *T. gondii* (YANG, CHANG e CHAO, 2004). Adicionalmente, SAG2A foi previamente descrita como um antígeno alvo potencial para imunoterapia contra a infecção, onde protocolos de imunização com SAG2A recombinante em adjuvante de Freund's foi capaz de proteger camundongos BALB/C em infecção experimental com doses letais de taquizoítos de *T. gondii* (MISHIMA et al, 2001).

As similaridades entre proteínas podem ser amplamente identificadas através de análises de bioinformática onde a aproximação entre alinhamento de diferentes sequências pode sugerir potenciais estruturas e funções de uma proteína desconhecida. A análise de motivos conhecidos e da SAG2A sugeriu que essa proteína apresenta sítios de fosforilação para CK2, cAMP e PKC, os quais podem ativamente modular a resposta imune inata contra o *T. gondii*. Durante invasão e proliferação dentro das células do hospedeiro, o parasito interage com proteínas na superfície celular, compartimento endossomal e citosol da célula do hospedeiro que induz a ativação de sinais intracelulares.

Há descrições na literatura de que a inter-relação entre *T. gondii* e as células do hospedeiro podem promover mudanças na concentração intracelular cAMP, o qual pode favorecer o crescimento e divisão do parasito (CHOI et al, 1990). Foi demonstrado neste estudo que SAG2A estimulou M Φ a produzirem quantidades elevadas de IL-10 e é possível especular que esse fenômeno pode ter ocorrido por ativação de cAMP diretamente induzida por SAG2A. Estudos têm mostrado que o aumento intracelular de cAMP durante a infecção por *T. gondii* em astrócitos bloqueou a produção de NO de forma IL-10-dependente e quando as células foram tratadas com inibidores de cAMP intracelular a secreção de IL-10 foi parcialmente bloqueada, restaurando a produção de NO em células de microglia tratadas com IFN- γ (ROZENFELD et al, 2003). O controle da produção de citocinas pro-inflamatórias é em grande parte promovida pela cascata de sinalização IL-10/STAT3 durante infecção por *T. gondii*. Esse controle é importante para minimizar o dano tecidual do hospedeiro, contudo previne a eliminação do parasito (MILLER et al, 2009). IL-10 é conhecida por diminuir a produção de IL-12, IL-1, IL-6,

TNF- α e também regular a produção de NO em macrófagos (NEYER et al, 1997). Em macrófagos peritoniais inflamatórios murinos, IL-10 interfere com a habilidade de IFN- γ em estimular a produção de TNF- α , resultando na diminuição da produção de NO, o qual é principalmente mediado através da supressão de reações arginina-dependentes (OSWALD et al, 1992). Adicionalmente, estudos sugerem que a indução de citocinas podem ser moduladas por sinais distintos do mecanismo de transdução envolvendo PKC (GRUNVALD et al, 1996; MASEK et al, 2006). Em M Φ estimulados com STAg, pode ser observado que PKC está envolvido na produção de TNF- α e IL-1 β , enquanto a expressão de IL-12 e IL-10 revelam sinais distintos de mecanismos de transdução envolvendo outras kinases (GRUNVALD et al, 1996). Com relação ao papel da CK2 na biologia de *T. gondii*, diferentes estudos tem revelado que a fosforilação dessa kinase está envolvido na ligação da toxofilina em monômeros de actina-G, fenômeno que é diretamente responsável pela motilidade parasitaria durante o *gliding* (DELORME et al, 2007; JAN et al, 2007)

O papel da IL-6 durante a infecção por *T. gondii* permanece incerto, sendo que estudos *in vitro* revelam que essa citocina pode aumentar a replicação do parasito intracelular, enquanto ela pode ter um papel protetor durante a infecção induzindo estágios de interconversão (JEBBARI et al, 1998). Notavelmente, análises computacionais de *motifs* de SAG2A revelou que essa proteína possui uma sequência com grande similaridade ao sitio de ligação da IL-6 humana. Essa informação sugere que o parasito pode usar esta propriedade para sequestrar a IL-6 produzida no ambiente inflamatório com objetivo de modular a resposta celular a seu favor. A inibição de citocinas favorece o escape de parasitos da resposta imune. Tripanosomas usam uma glicoproteína específica de superfície para ativamente ligar-se a TNF- α e através dessa interação inibi a morte de tripanosomas mediada pela citocina (MAGEZ et al, 2001). *Plasmodium falciparum* secreta uma proteína homologa ao fator de inibição da migração de macrófago (MIF), o qual se liga ao receptor de MIF de células de mamíferos (CD74), interferindo com ativação de células do hospedeiro através de mecanismos competitivos de ligação (DOBSON et al, 2009). Em adição, tem sido descrito que ovos de *Schistosoma mansoni* secretam uma proteína nos tecidos do hospedeiro que é capaz de ligar-se a quimiocinas inibindo sua interação com receptores do hospedeiro, suprimindo a reação inflamatória em diversos modelos experimentais (SMITH et al, 2005). Eventos similares são observados através da saliva de carrapatos *Ixodideos* ou extrato de saliva da espécie

do *Rhipicephalus*, os quais revelam capacidade para capturar IL-2, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11, modulando a atividade das células imune em favor do ectoparasita (VANCOVÁ et al, 2007).

6. CONCLUSÕES

- Proteína SAG2A recombinante de *Toxoplasma gondii* pode ser obtida a partir de sistema de expressão em bactérias *E. coli* Rosetta cepa DE3;
- *Toxoplasma gondii* possui capacidade modulatória da resposta imune de macrófagos e células dendríticas;
- Mecanismo de supressão de BMDCs por *Toxoplasma gondii* é independente de TLR4, possivelmente existindo vias de sinalização comum entre outros TLRs;
- Efeito de inibição de *Toxoplasma gondii* não requer interação de parasito vivos com células do sistema imune inato;
- O bloqueio do epítipo imunodominante da proteína SAG2A por mAb A4D12 reverte parcialmente a modulação negativa de células do sistema imune inato induzidas por *Toxoplasma gondii*;
- A diminuição da produção de IL-12 e NO em células ativadas, em adição do aumento da expressão de IL-10 sugere que possivelmente *T. gondii* utiliza a expressão de SAG2A para aumentar as concentrações intracelulares de AMP cíclico, modulando ativamente a cascata de sinalização intracelular de DCs e MΦ;
- Proteína SAG2A possui capacidade de captação da citocina IL-6 por *motifs* com elevada homologia ao receptor da citocina IL-6, o que pode representar um importante mecanismo de modulação negativa da resposta imune inata ao parasito.

REFERÊNCIAS

- AJIOKA, J.W.; FITZPATRICK, J.M.; REITTER, C.P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp Rev Mol Med*. V. 6, p. 1-19, 2001.
- BÉLA, S.R.; SILVA, D.A.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; PIROVANI, C.P.; CHAVES-BORGES, F.A.; CARVALHO, F.R.; OLIVEIRA, T.C.; MINEO, J.R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diag Microbiol Inf Dis*. v. 6, p. 245–254, 2008.
- BHOPALE, G.M. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes and Infection*. v. 5, p. 457-462, 2003.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol R*. v. 64, p. 607-623, 2000.
- BLADER, I.J.; SAEIJ, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion and virulence. *APMIS*. v. 117, p. 458-476, 2009.
- BOYLE, J.P.; SAEIJ, J.P.J.; HARADA, S.Y.; AJIOKA, J.W.; BOOTHROYD, J.C. Expression quantitative trait locus mapping of *Toxoplasma* genes reveals multiple mechanisms for strain-specific differences in gene expression. *Eukariot Cell*. v. 7, p. 1403–1414, 2008.
- BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect Immun*. v. 70, p. 5216–5224, 2002.
- BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol*. v. 22, p. 448-452, 2006.

CANTOS, G.A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii e diagnóstico. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 46, p. 335-341, 2000.

CARMO, A.C.Z.; BOTTOM, S.R.; FLECK, J.; BECK, S.T. Importância do rastreamento pré-concepcional e pré-natal da infecção por *T. gondii*. Prevalência sorológica em um hospital público. Revista Brasileira de Análises Clínicas. v. 37, p. 49-52, 2005.

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

CHOI, W.; NAM, H.W.; YOUN, J.H.; KIM, D.J.; KIM, W.K.; KIM, W.S. The effect of cyclic AMP on the growth of *Toxoplasma gondii in vitro*. The Korean Journ Parasitol. v. 28, p. 71-78, 1990.

CLEARY, M.D.; SINGH, U.; BLADER, I.J.; BREWER, J.L. BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii* Asexual Development: Identification of Developmentally Regulated Genes and Distinct Patterns of Gene Expression. Euk Cell. v. 1, p. 329-340, 2002.

CONG, H.; GU, Q.M.; JIANG, Y; HE, S.Y.; ZHOU, H.Y.; YANG, T.T.; LI, Y.; ZHAO, Q.L. Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. v. 27, p. 29-35, 2005.

CUNHA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; SOUZA, M.A.; SOUZA, G.R.L.; PRUDÊNCIO, C.R.; PIROVANI, C.P.; CASCARDO, J.C.M.; BARBOSA, B.F.; GOULART, L.R.; MINEO, J.R. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. Immunobiology. v. 215, p. 26-37, 2010.

DALGIÇ, N. Congenital *Toxoplasma gondii* infection. Marmara Med Journ. v. 21, p. 089-101, 2008.

DELORME, V.; CAYLA, X.; FAURE, G.; GARCIA, A.; TARDIEUX, I. Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* Toxofilin Violaine. Mol Biol Cell. v. 14, p. 1900–1912, 2003.

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

DOBSON, S.E.; AUGUSTIJN, K.D.; BRANNIGAN, J.A.; SCHNICK, C.; JANSE, C.J.; DODSON, E.J.; WATERS, A.P.; WILKINSON, A.J. The crystal structures of macrophage migration inhibitory factor from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. Protein Science. v. 18, p. 2578-2591, 2009.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. Veterinary Parasitol. v. 126, p. 57–72, 2004.

GRIMWOOD, J.; SMITH, J.E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int J Parasitol. v. 26, p. 169-173, 1996.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. Annali dell'Istituto superiore di sanità, v. 40, p. 65-70, 2004.

GRUNVALD, E.; CHIARAMONTE, M.; HIENY, S.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; VOGEL, S.N.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A. Biochemical Characterization and Protein Kinase C Dependency of Monokine-Inducing Activities of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. v. 64, p. 2010–2018, 1996.

HAIJ, H.E.; LEBRUN, M.; AROLD, S.T.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, F.J. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog. V. 3, p. 200-211, 2007.

HEGAB, S.M.; AL-MUTAWA, S.A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. Clin Exp Med. v. 3, p. 84–105, 2003.

HEINTZELMAN, M. B.; SCHWARTZMAN, J.D. Myosin diversity in Apicomplexa. J Parasitol. v. 87, p. 429-432, 2001.

HETTMANN, C.; HERM, A.; GEITER, A.; FRANK, B.; ACHWARZ, E.; SOLDATI, T.; SOLDATI, D.A. Dibasic motif in the tail of a class XIV Apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. Mol Biol Cell. v. 11, p. 1385-1400, 2000.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. v. 8, p. 634-640, 2002.

HUANG, X.; XUAN, X.; KIMBITA, E.N.; BATTUR, B.; MIYAZAWA, T.; FUKUMOTO, S.; MISHIMA, M.; MAKALA, L.H.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; IGARASHI, I. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Recombinant SAG2 for Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Cats. J Parasitol, v. 88, p. 804-807, 2002.

JAN, G.; DELORME, V.; DAVID, V.; REVENU, C.; REBOLLO, A.; CAYLA, X.; TARDIEUX, I. The Toxofilin-actin-PP2C complex of *Toxoplasma*: identification of interacting domains. Biochem J. v. 401, p. 711-719, 2007.

JEBBARI, H.; ROBERTS, C.W.; FERGUSON, D.J.P.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. v. 20, p. 231-239, 1998.

JUNG, C.; LEE, C.Y.; GRIGG, M.E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. Int J Parasitol. v. 34. p. 285-296, 2004.

KIM, S.; BOOTHROYD, J.C. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. J Immunol. v. 174, p. 8038-8048, 2005.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. v. 256, p. 495–497, 1975.

KONG, J.; GRINGG, M.E.; UYETAKE, L.; PARMLEY, S.; BOOTHROYD, J.C. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis*. v. 187, p. 1484-1495, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680-685, 1970.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D.J.P.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*. v. 96, p. 89–96, 2000.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D.J.P.; GRIGG, M.E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J.C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol*. v. 31, p. 1285-1292, 2001.

LENG, J.; BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. Dysregulation of macrophage signal transduction by *Toxoplasma gondii*: past progress and recent advances. *Parasite Immunol*. v. 31, p. 717–728, 2009.

LIN, G.Z.; LIAN, Y.J.; RYU, J.H.; SUNG, M.K.; PARK, J.S.; PARK, H.J.; PARK, B.K.; SHIN, J.S.; LEE, M.S.; CHEON, C.I. Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif*. v. 55, p. 287–292, 2007.

LYONS, R.E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitol*. v. 18, p. 198-201, 2002.

MAGEZ, S.; RADWANSKA, M.; STIJLEMANS, B.; XONG, H.V.; PAYS, E.; DE BAETSELIER, P. A conserved flagellar pocket exposed high mannose moiety is used by African Trypanosomes as a host cytokine binding molecule. *J Biol Chem*. v. 276, p. 33458–33464, 2001.

MAROBIN, L.; FLÔRES, M.L.; RIZZATTI, B.B.; SEGABINAZI, S.D.; LAGAGGIO, V.R.; GRIGULO, M.; SCALCO, M.A. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) em diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. *Braz J Vet Res Ani Sci.* v. 41, p. 5-9, 2004.

MASEK, K.S.; FIORE, J.; LEITGES, M.; YAN, S.F.; FREEDMAN, B.D.; HUNTER, C.A. Host cell Ca²⁺ and protein kinase C regulate innate recognition of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* v. 119, p. 4565-4573, 2006.

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

MINEO, J.R.; KHAN, I.A.; KASPER, L.H. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. *Exp Parasitol.* v. 79, p. 351-361, 1994.

MINEO, J.R.; CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. *Infect Immun.* v. 27, p. 283-287, 1980.

MINEO, T.W.P.; OLIVEIRA, C.J.F.; SILVA, D.A.O.; OLIVEIRA, L.L.; ABATEPAULO, A.R.; RIBEIRO, D.P.; FERREIRA, B.R.; MINEO, J.R.; SILVA, J.S. *Neospora caninum* excreted/secreted antigens trigger CCR5 dependent cell migration. *Int J Parasitol.* *in press.*, 2010.

MISHIMA, M.; XUAN, X.; SHIODA, A.; OMATA, Y.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. *J Vet Med Sci.* v. 63, p. 433-438, 2001.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet.* v. 363, p.1965-1975, 2004.

MONTOYA, J.G.; ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. *Clin Perinatol.* v. 32, p. 705- 726, 2005.

NEYER, L.E.; GRÜNIG, G.; FORT, M.; REMINGTON, J.S.; RENNICK, D.; HUNTER, C.A. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* v. 65, p. 1675–1682, 1997.

NISHIKAWA, Y.; KAWASE, O.; VIELEMEYER, O.; SUZUKI, H.; JOINER, K.A.; XUAN, X.; NAGASAWA, H. *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. *Parasite Immunol.* v. 29, p. 375-385, 2007.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon γ -induced activation. *Immunology.* v. 89, p. 8676-8680, 1992.

POLLARD, A.M.; KNOLL, L.J.; MORDUE, D.J. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. *Trends Parasitol.* v. 25, p. 491-494, 2009.

RISCO-CASTILHO, V. FERNÁNDEZ-GARCÍA, A. ZABALLOS, A.; AGUARDO-MARTÍNEZ, A.; HEMPHIL, A.; RODRÍGUES-BERTOS, A.; ÁLVEREZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Molecular characterisation of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* v. 37, p. 887–896, 2007.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R.T.; BOZZA, M.T.; LIMA, F.R.; PIRES, A.L.; SILVA, P.M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; DE SOUZA, W.; MOURA-NETO, V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. *Infect Immun.* v. 71, p. 2047–2057, 2003

SAEI, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* v. 21, p. 476-481, 2005.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. J Immunol. v. 139, p. 221-227, 1987.

SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. Congenital Toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. Journal of Tropical Pediatrics, v. 50, p. 50-53, 2004.

SEIPEL, D.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; BARCELOS, M.W.; RAMALHO, A.V.; KANASHIRO, M.M.; KIPNIS, T.L.; ARNHOLDT, A.C. Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability. APMIS. v. 117, p. 672-680, 2009.

SIBLEY, L.D. Recent origins among ancient parasites. Vet Parasitol. v. 115, p. 185-198, 2003.

SINAI, A.P. The *Toxoplasma* Kinase ROP18: an active member of a degenerate family. PLoS Pathogens. V. 3, p. 135-137, 2007.

SMITH, P.; FALLON, R.E.; MANGAN, N.E.; WALSH, C.M.; SARAIVA, M.; SAYERS, J.R.; MCKENZIE, A.N.; ALCAMI, A.; FALLON, P.G. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. J Exp Med. v. 10, p. 1319–1325, 2005.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J Mol Biol. v. 79. p. 237-248, 1973.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. Trends parasitol. V. 22, p. 137-42, 2006.

TAWEENAN, W. Vaccination against toxoplasmosis imune response in mice imunised with a recombinant *Toxoplasma gondii* antigen. Master of Science Thesis. Reposrt n 41, p 1403-2201, 2004.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S.J.; TANG, K.; BEATTY, W.L.; HAJJ, H.E.; JEROME, M.; BEHNKE, M.S.; WHITE, M.; WOOTTON, J.C.; SIBLEY, L.D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. v. 314, p. 1776-1779, 2006.

TENTER, A.M.; HECKERITH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, v. 30, p.1217-1258, 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 76. p. 4350-4356, 1979.

VAN, T.T.; KIM, S.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J.C.; KNOLL, L.J. The BSR4 protein is up-regulated in *Toxoplasma gondii* bradyzoites, however the dominant surface recognized by the P36 monoclonal antibody is SRS9. *Int J Parasitol*. v. 37. p. 877-885, 2007.

VANCOVÁ, I.; SLOVÁK, M.; HAJNICKÁ, V.; LABUDA, M.; SIMO, L.; PETERKOVÁ, K.; HAILS, R.S.; NUTTALL, P.A. Tick anti-chemokine dynamics differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding. *Parasite Immunol*. v. 29, p. 169–177, 2007.

YAMAMOTO, M.; STANDLEY, D.M.; TAKASHIMA, S.; SAIGA, H.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; KUBO, E.; ITO, H.; TAKAURA, M.; MATSUDA, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of STAT3. *J Exp Med*. v. 206, p. 2747-2760, 2009.

YANG, C.; CHANG, G.; CHAO, D. Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2. *Parasitol Res*. v. 92, p. 58–64, 2004.

ZAMBONI, D.S.; RABINOVITCH, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect Immun*. v. 71, p. 1225-1233, 2003.