

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

João Roberto Neto

Participação da Fosfatidilserina exposta por *Toxoplasma gondii* na indução de Corpúsculos Lipídicos em Macrófago

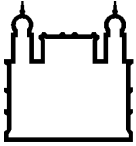
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Prof. Dr^a. Patrícia Torres Bozza

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

João Roberto Neto

Participação da Fosfatidilserina exposta por *Toxoplasma gondii* na indução de Corpúsculos Lipídicos em Macrófagos

ORIENTADORES: Prof. Dr^a. Patrícia Torres Bozza

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Kátia da Silva Calabrese - **Presidente**

Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra

SUPLENTE E REVISORA

Prof. Dr^a Adriana Vallochi

Rio de Janeiro, 07 de Junho de 2013

Bem sei eu que tudo Podes, e que nenhum dos Teus propósitos pode ser impedido.

Jó 42:2

Agradecimento

Ao Deus, o único, eterno e vivo;

À minha Esposa Milena Queiroz, que tanto me ajudou em dias de crise sempre com uma boa palavra de ânimo e todo carinho; e a meu filho Davi Queiroz Roberto.

À meu Pai, Paulo Roberto, minha mãe, Maria Eliza Neves e a meu irmão Paulo Roberto Junior. Só cheguei até esse dia porque vocês acreditaram e investiram em mim.

A meus orientadores Patrícia Bozza e Renato DaMatta, por sempre me auxiliarem no caminho do conhecimento, pela paciência e toda ajuda e também da contribuição intelectual da pesquisadora Dr^a Adriana Vallochi.

Aos meus amigos e colegas de laboratório (Imunofarmacologia), pelo auxílio, brincadeiras e companheirismo durante todo esse tempo.

Ao grupo da Dr^a Helene Barbosa, cito a querida Sandra.

Ao grupo do Dr. Sergio Seabra sempre pronto à contribuir para meu crescimento científico.

Ao Meu amigo Henrique Carneiro, obrigado por todo esse tempo de amizade, por saber que durante os dias difíceis nessa caminhada pude contar com você.

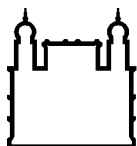
À Igreja Betel que me recebeu aqui no Rio de Janeiro, cito em especial Andréia Massa e Marcos Massa...na dificuldade se faz um irmão... é verdade! Eu fiz! Obrigado.

À Universidade Estadual da Zona Oeste, na figura do Dr. Sergio Seabra;

À Universidade Estadual Norte Fluminense, na figura do Dr. Renato DaMatta;

À Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz e ao programa de pós graduação em Medicina Tropical, pela oportunidade.

As agencias de fomento: CNPQ, CAPES e FAPERJ pelo investimento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Participação da Fosfatidilserina exposta por *Toxoplasma gondii* na indução de Corpúsculos Lipídicos em Macrófagos

RESUMO

João Roberto Neto

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, doença distribuída em grande parte do globo infectando vertebrados endotérmicos. *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório e não sintetiza colesterol, recrutando-o da célula hospedeira. Esse parasito é dividido em grupos, de acordo com a virulência, sendo a cepa RH e a cepa ME-49 representantes de parasitos de maior e de moderada virulência, respectivamente. Semelhante a outros parasitos protozoários, *T. gondii* expõem fosfatidilserina (PS) na membrana externa, sendo um exemplo do mimetismo apoptótico, o que tem sido sugerido como mecanismo de evasão. Corpúsculos lipídicos (CL) são organelas lipídicas comumente encontradas em uma gama de diferentes células, de plantas, parasitos e animais. CL são modulados positivamente por diferentes fatores, incluindo células apoptóticas, parasitos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. e *Plasmodium falciparum* e citocinas, como o fator de transformação do crescimento (TGF- β). Nosso trabalho visou investigar se a PS exposta na membrana plasmática de *T. gondii* pode induzir CL em macrófagos. Independente da virulência da cepa utilizada, *T. gondii* foi capaz de induzir CL em macrófagos infectados. A indução foi maior com aumento da relação parasito/macrófago. Subpopulações de *T. gondii*, PS positivos (PS+) e PS negativo (PS-) foram obtidas e a subpopulação de PS + induziu mais CL em relação a subpopulação de PS-. A neutralização da PS dos parasitos PS+ ou da população total com anexina-V foi capaz de reduzir o número de CL nas células hospedeiras. Lipossomos contendo PS induziram mais CL em macrófagos quando comparados aos lipossomos sem PS. Curiosamente, parasitos PS- também foram capazes de aumentar o número de CL em macrófagos, sugerindo a participação de outros fatores nesse processo indutor. Após a interação de macrófagos com *T. gondii*, observamos aumento no número de CL tanto em células que continham o parasita quanto em células vizinhas não parasitadas. Esse achado sugere uma sinalização

parácrina entre as células. O TGF- β é descrito como sendo secretado após infecção por *T. gondii*, e sua neutralização causou inibição da formação de CL induzido por *T. gondii*, revelando sua participação nesse processo. Concluímos que *T. gondii* é capaz de induzir CL em macrófagos, e essa indução tem a participação da PS exposta em sua membrana. A indução dessas organelas ocorreu independente da virulência da cepa. Esse processo é potencializado pela ação parácrina do TGF- β .

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, Corpúsculos lipídicos, Macrófagos, Fosfatidilserina e Mimetismo Apoptótico.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is the causative agent of toxoplasmosis, a disease largely spread across the globe infecting almost any endothermic vertebrates. *T. gondii* is an obligatory intracellular parasite that can not synthesize cholesterol thus relying on recruiting it from the host cell. This parasite is divided into groups according to the virulence, and the RH strain and the ME-49 strain representing highly and moderate virulent parasites, respectively. Similar to other protozoan parasites, *T. gondii* exposes phosphatidylserine (PS) on the outer membrane, an example of the apoptotic mimicry, which has been suggested as a mechanism of evasion,. Lipid bodies (LB) are lipid organelles commonly found in a range of different cells of plants, animals and parasites. LB are positively modulated by different factors, including apoptotic cells, parasites such as *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. and *Plasmodium falciparum* and cytokines such as transforming growth factor (TGF- β) . Our study aimed to investigate whether the PS exposed on the plasma membrane of *T. gondii* in macrophages can induce LB. *T. gondii* was capable of inducing LB in infected macrophages, independently of the virulence of the strain used. The LB induction was greater with increase in parasite / macrophage ratio. Subpopulations of *T. gondii* positive PS (PS+) and negative (PS-) were obtained and PS+ subpopulation induced significantly greater LB formation compared to PS- subpopulation. The neutralization of PS with annexin - V was able to reduce the number of LB on PS+ parasites or on the total parasite population, but not on PS- parasites. Liposomes containing PS induced more LB than liposomes without PS. Interestingly, PS-parasites induced LB formation in macrophages, suggesting the involvement of other factors. After interaction of *T. gondii* with macrophages, we observed increased LB formation both in cells containing internalized parasites as well as in bystander cells without internalized parasites, suggestive of a paracrine signaling. TGF- β is described as being secreted after infection with *T. gondii* and its neutralization caused inhibition of *T. gondii*-induced LB formation, pointing to TGF- β participation in this process. We conclude that *T. gondii* is able to induce LB formation in macrophages. The induction of these organelles was independent of strain virulence. *T. gondii*-induced LB formation occurs through signaling triggered by PS

exposed on the parasite membrane. This process is also amplified by TGF- β acting in a paracrine fashion.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Corpuscles lipid, Macrophages, Phosphatidylserine and Apoptotic Mimicry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes de infecção por *T. gondii* em seres humanos.

Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Figura 3. Modelo integrado de invasão de *Toxoplasma gondii*.

Figura 4. Resposta imune inata de *Toxoplasma gondii* durante a infecção.

Figura 5. Composição lipídica e protéica de corpúsculo lipídico.

Figura 6. Modelos de gênese de corpúsculo lipídico.

Figura 7. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados.

Figura 8. Biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*.

Figura 9. Relação crescente da quantidade de corpúsculos lipídicos com quantidade de parasitos.

Figura 10. Verificação de pureza das subpopulações de *Toxoplasma gondii*, fosfatidilserina positiva (PS+) e fosfatidilserina negativa (PS-).

Figura 11. Indução de corpúsculos pelas diferentes subpopulações de *T. gondii*.

Figura 12. O potencial indutor de corpúsculos lipídicos não é perdido pela separação magnética.

Figura 13. Indução de corpúsculos lipídicos frente à neutralização da fosfatidilserina por anexina V.

Figura 14. Verificação de indução de corpúsculos lipídicos por lipossomos purificados contendo fosfatidilcolina e/ou fosfatidilserina.

Figura 15. Imagem representativa dos dois principais fenótipos encontrado em macrófagos após a infecção por *T. gondii*.

Figura 16. Quantificação da frequência de células com corpúsculos lipídicos na presença ou ausência de *Toxoplasma gondii*.

Figura 17. Quantificação de corpúsculos lipídicos em células que apresentam o parasito internalizado ou não.

Figura 18. Indução de CL em macrófagos infectados com diferentes subpopulações de *T. gondii* com ou sem neutralização de TGF-beta.

Índice

1 - Introdução	22
1.1 - <i>Toxoplasma gondii</i>	22
1.2 – Biologia do <i>Toxoplasma gondii</i> na invasão da célula hospedeira	27
1.3 - Resposta Imunológica deflagrada pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	30
1.4 - <i>Toxoplasma gondii</i> e a relação com os lipídeos da célula hospedeira	33
1.5 – Corpúsculo Lipídico.....	34
1.6 – Regulação da Apoptose e Mimetismo Apoptótico.....	41
2 - Objetivos	43
2.1 - Geral	43
2.2 - Específicos.....	43
3 – Materiais e Métodos	44
3.1 – Reagentes.....	44
3.2 – Células	44
3.3 – Parasitos	46
3.4 – Infecção.....	47
3.5 – Tratamentos	47
3.6 – Marcação, contagem e análise de Corpúsculo Lipídico	48
3.7 – Análise Estatística.....	49
4 - Resultados	50
4.1 – A cepa Rh de <i>Toxoplasma gondii</i> é capaz de induzir corpúsculos lipídicos independente da cepa.....	50
4.2 – Confirmação da reprodutibilidade e pureza da separação de subpopulações de PS+ e PS- do <i>Toxoplasma gondii</i>	54
4.3 – A população PS+ é capaz de induzir significativamente mais CL	54
4.4 – Participação da PS da membrana do <i>T. gondii</i> na indução de CL.....	57
4.5 – Macrófagos infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> apresentaram dois principais fenótipos com corpúsculos lipídicos: presença ou ausência do parasito.	61
4.6 – Participação do TGF-beta na indução de corpúsculo lipídico após interação com <i>Toxoplasma gondii</i>	61
5 - Discussão.....	66
6 - Referências Bibliográficas.....	72

1 - Introdução

1.1 - *Toxoplasma gondii*

A primeira descrição de *Toxoplasma gondii* foi relatada em dois locais quase que simultaneamente: no período de (1908-1909) Nicolle e Mancaeux observaram o parasito no roedor *Ctenodactylus gundi*, e no Brasil o Dr. Splendore observou em coelho doméstico, *Oryctolagus cuniculus* (1908). O curioso na descoberta dessa doença e seu agente patogênico é que, diferente das demais patologias, o agente foi identificado pela primeira vez em animais de laboratório. Os dois grupos nas primeiras observações acreditaram ser uma espécie de *Leishmania*. Logo perceberam se tratar de um novo parasito e assim denominaram com o nome que temos hoje, *Toxoplasma gondii* (Splendore, 1908; Nicolle e Mancaeux, 1909)

O primeiro isolado de *T. gondii* foi obtido por Sabin e Olitsky (1937). Aproximadamente trinta anos depois de sua descoberta foi visto em aves, além de vários mamíferos diferentes (Sabin e Olitsky 1937). O fenômeno de infectar uma grande diversidade de animais foi importante para atribuir uma característica a esse parasito, ser heteroxênico facultativo.

As muitas descobertas decorridas ao longo dos anos a respeito desse parasito, nos fez saber hoje que *T. gondii* possui um ciclo de vida complexo e de larga abrangência. O agente patogênico pode ser transmitido do hospedeiro definitivo ao intermediário (ciclo sexuado), entre os hospedeiros intermediários ou mesmo entre hospedeiros definitivos (ciclo assexuado). As características físicas do ambiente e as populações de hospedeiros são fatores que influenciam o ciclo sexuado e assexuado, alterando assim a dinâmica de transmissão desse parasito (Gilot-Fromont et al., 2006).

A reprodução sexuada somente ocorre nos enterócitos de espécies da família dos felinos. Os gatos domésticos ou selvagens são os grandes representantes dos hospedeiros definitivos desse parasito. Após a ingestão de cistos presentes nos tecidos de um hospedeiro definitivo ou intermediário (carnivorismo) (figura 1), a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas dos felídeos. Esse fenômeno libera dos cistos os bradizoítos, essa forma infectante apresenta velocidade lenta de multiplicação, recebendo esse nome do grego Bradi que significa “lento” (Goldman et al., 1958) e são os responsáveis por infectarem os enterócitos no interior do

intestino. Havendo sucesso na infecção das células intestinais, há multiplicação assexuada, caracterizada pelo desenvolvimento de merozoítos dentro dos esquizontes (figura 1) (Dubey, 1998). Esse primeiro passo do ciclo nos felinos é seguido pela formação dos gametas (gametogonia) (Dubey e Frenkel 1972; revisto por Ferguson, 2002). Com as condições necessárias, ocorre então à fecundação dos gametas dentro dos enterócitos, descrevendo assim a formação do oocisto (figura 1). As fezes dos felinos são os grandes responsáveis pela propagação dos oocistos no ambiente. Após alguns dias no ambiente externo, já é possível observar o processo de esporogonia nos oocistos; essa mudança entre outros fatores é caracterizada por transformações morfológicas e redução meiótica dos oocistos (figura 2). (Dubey e Frenkel 1972; revisto por Jones e Dubey, 2010)

Os gatos são capazes de liberar oocisto de 3 – 7 dias após a ingestão de cistos de tecidos, e esse processo de contaminação do ambiente pode ocorrer ainda por 20 dias. Gatos contaminados liberam por volta de 100 milhões de oocisto nas fezes (Dubey e Frenkel, 1972; Jones e Dubey, 2010). Esses números podem ainda serem maiores quando lembramos que esses oocistos liberados podem infectar praticamente todos os animais de sangue quente, de mamíferos às aves, e contaminar a água (Dubey e Frenkel, 1972; Jones e Dubey, 2010).

Os dados apresentados refletem na transmissão no parasito, já que a maioria das transmissões em humanos ocorre pela ingestão dos cistos presente nos tecidos em carne infectada e ingestão de água ou alimentos contaminados com os cistos (Silveira C. et al., 1988; Berribi et al., 2010) (figura 1).

Dentro dos hospedeiros intermediários, o parasito sofre apenas reprodução assexuada. O processo de entrada do parasito na célula hospedeira apresenta propriedades importantes. A elevada mobilidade do parasito, sua interação com a célula hospedeira envolvendo a proteína do parasito MIC2, e as moléculas de adesão da célula hospedeira (ICAM) são fatores presentes na passagem de *T. gondii* pela barreira de células intestinais (Lambert e Barragan, 2010). A ação enzimática é importante para a liberação ativa dos esporozoítos que infectam o epitélio intestinal, e logo se diferenciam em taquizoítos (figura 2). Os taquizoítos são formas proliferativas ou endozoítos, e se reproduzem pelo processo de endodiogenia (Goldman et al., 1958). Além disso, os taquizoítos possuem a importante característica de se reproduzirem dentro de qualquer tipo de célula

nucleada e de se disseminarem por todo o organismo do hospedeiro. Em 7 dias pós a infecção, já é possível ver a formação de cistos nos tecidos musculares e no sistema nervoso central dos hospedeiros intermediários e lá podem permanecer por toda a vida. Se a fase aguda, ou seja, a fase de multiplicação rápida, ocorrer durante o processo de gestação, parasito pode atravessar a placenta e infectar o feto (infecção congênita) (figura 1) (Hide et al., 2001).

A infecção do parasito no homem, em sua grande maioria, registrado em diversos países diferentes, se apresenta como assintomática. Porém, há casos de infecção que se desenvolvem para clinica, neles foi observado no pacientes, febre, mialgia, astenia e outros sintomas clínicos não específicos (Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto no Brasil a gravidade está associada ao desenvolvimento de retinocoroidite. (Valloch et al., 2005). Quando o individuo infectado é imunocomprometido, os sintomas clínicos são mais graves e mais facilmente observáveis. Nesses indivíduos a toxoplasmose cerebral é a manifestação mais predominante da doença (Luft e Remington, 1992).

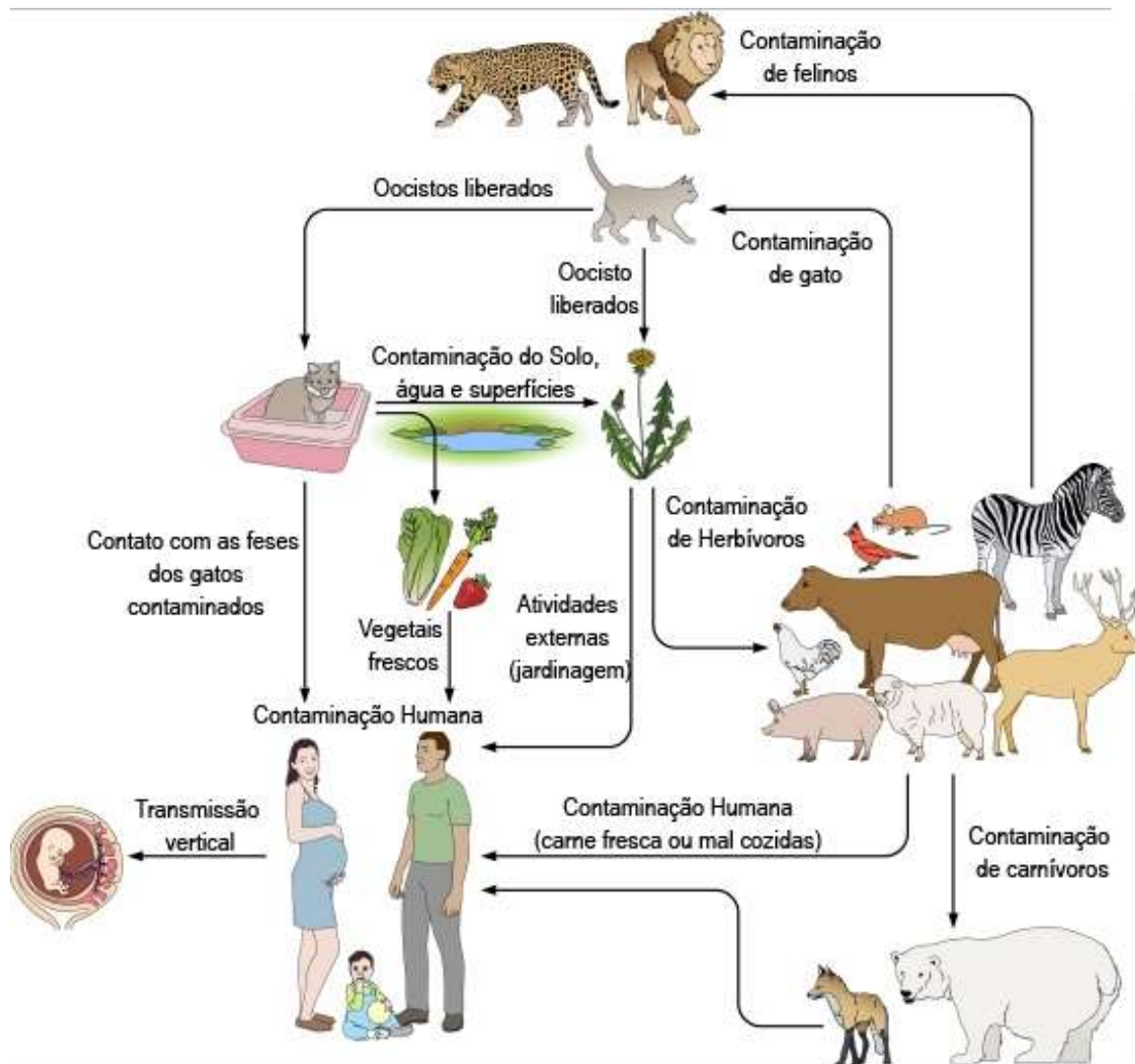


Figura 1 – Fontes de infecção por *T. gondii* em seres humanos. Os gatos são infectados pela ingestão de oocistos liberados por outros gatos ou mesmo pelo carnivorismo de ratos. Os gatos infectados liberam os oocistos no ambiente pelas fezes e também contaminam a água, alimentos e solo. Os humanos são acometidos pela infecção quando ingerem os alimentos e água contaminada, ou carne fresca (ou mal cozida) infectada. Quando o indivíduo infectado for uma gestante, há o risco de transmissão do parasito para o feto pela via transplacentária (infecção vertical). A representação do ciclo selvagem corre principalmente pelas relações de teias alimentares.

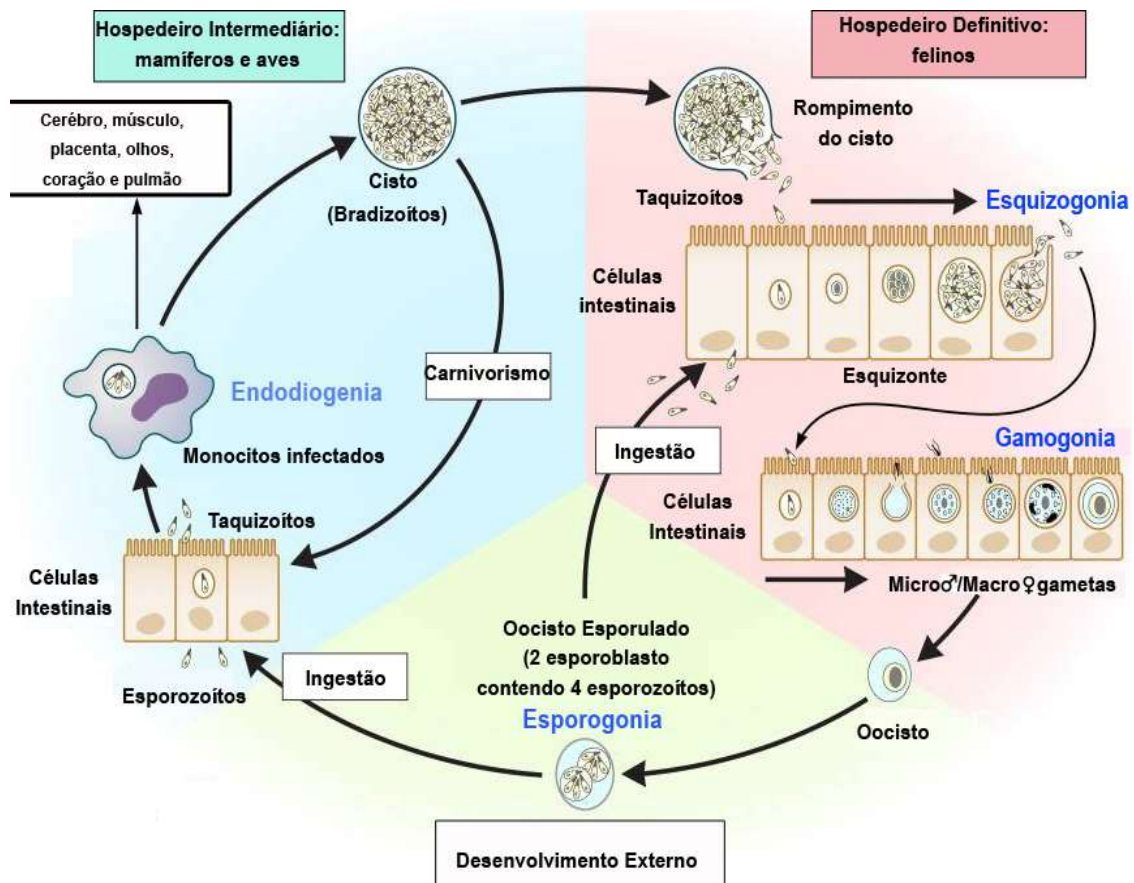


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. São mostradas a biologia, infecção e replicação das três fases infecciosas dos parasitas em seus respectivos hospedeiros. O gato como representante dos hospedeiros definitivos são infectados pelos taquizoítos que darão origem a forma esquizonte e formação dos gametas, caracterizando a reprodução sexuada. O oocisto entra em esporogonia no desenvolvimento externo e é ingerido por outros felinos ou por mamíferos e aves, nesses últimos o ciclo no hospedeiro intermediário ocorre culminando no desenvolvimento assexuado. Fonte: Adaptado de Gangneux e Dardé (2012).

O parasito apresenta características, como ciclo sexuado e capacidade de infectar diferentes animais e modelos celulares, que poderiam gerar grande diversidade genética dentro da espécie. Entretanto, o que foi observado e sugerido durante anos é serem clonais e com baixa diversidade dentro da espécie (Dardé et al., 1992; Howe e Sibley, 1995). Estudos genéticos profundos possibilitaram o agrupamento dos isolados em três grupos, tipo I, tipo II e tipo III (Darde et al., 1988; Pestre-Alexandre et al., 1992; Sibley e Boothroyd, 1992; Howe e Sibley, 1995; Dardé et al., 2002). Essas três linhagens foram caracterizadas geneticamente, mas é importante lembrar que ainda é difícil associar sintomas ou causas patológicas a algum tipo de linhagem.

Linhagens do tipo I, como a RH, são altamente virulentas. Em geral, formam menos cistos em cultura e em animais, e têm sido observados em casos de toxoplasmose ocular em pacientes imunocomprometidos (Boothroyd e Grigg, 2002; Kim e Weiss, 2004). As linhagens do tipo II, como a ME-49, são menos virulentas em geral são cepas cistogênicas e em muitos estudos nos Estados Unidos da América e países da Europa são as mais prevalentes causas da toxoplasmose humana, mais especificamente com relação à infecção congênita e em pacientes com AIDS. Já as cepas isoladas de animais são na sua maioria do genótipo III, que são cepas moderadamente virulentas (Howe e Sibley, 1995; revisto em Weiss e Kim, 2000; Ajzenberg et al., 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004).

1.2 – Biologia do *Toxoplasma gondii* na invasão da célula hospedeira

A característica de *T. gondii* invadir uma gama de células hospedeiras é realmente notável e importante, e parte desse sucesso pode ser atribuído ao processo invasivo desse protozoário (Sibley et al., 1998). *Toxoplasma gondii* possui o processo de invasão ativo, dependente da mobilidade, e de uma série sequencial de secreção de proteínas das seguintes organelas: micronemas, roptrias e grânulos densos (Dobrowolski e Sibley, 1996; Sibley et al., 1998; Carruthers e Boothroyd, 2007).

O primeiro passo desse processo invasivo do parasito é a adesão na membrana plasmática da célula hospedeira. A membrana do taquizoíto é revestida por proteínas de superfície ancoradas por GPI (SAGs). Essa família se mostrou importante para o processo invasivo na célula hospedeira, uma vez que

neutralizadas podem impedir o sucesso da invasão (figura 3) (Mineo e Kasper, 1994). A invasão do parasito ocorre de forma polarizada, com a porção apical dos parasitos em contato com a célula alvo para iniciar a penetração (Sibley et al., 1999). Com o ambiente propicio, há a secreção de algumas proteínas das micronemas, entre elas destacamos a proteína MIC2. Essa proteína irá reconhecer receptores de membrana da célula hospedeira, reorientar o parasito e promover a adesão entre as células (Sibley et al., 1999) (figura 3). A entrada do parasito é um processo muito rápido, pode durar de 15 a 30 milissegundos. *Toxoplasma gondii* promove uma associação muito forte entre as membranas plasmáticas, sua e da célula hospedeira. Sua membrana é composta por algumas proteínas que formam um complexo chamado de junção móvel (figura 2). Essa junção se move em direção à extremidade posterior do parasito, levando a sua internalização no vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula hospedeira. A função dessa junção móvel é de distribuir por toda a superfície do parasito um antígeno de membrana apical (AMA1), secretado pelos micronemas, e a inserção de proteínas no vacúolo parasitóforo secretadas por outra importante organela do parasito, a roptria (figura 2). Nos últimos anos, tem sido descrito a função crucial de algumas proteínas da róptria para o sucesso da infecção do parasito, destaca-se algumas: a ROP2, essa proteína são lectinas que reconhecem polissacarídeos, já ROP 18 está associada à fase citosólica do vacúolo parasitóforo, fosforilando as IRGs (immunity related GTPases) impedindo que destruam o parasito, além de ter sua função atribuída na virulência de diferentes cepas (El Hajj et al., 2007; Sibley et al., 2012), ROP 16 é capaz de manipular a expressão gênica do hospedeiro na secreção de citocinas, esse mecanismo passa pela fosforilação de STAT 3/6 (Robben et al., 2004; Saeij et al., 2006)

Os grânulos densos são organelas presentes no parasito, importante nas primeiras horas de invasão e formação do vacúolo parasitóforo. A maioria das proteínas transmembranas das células hospedeiras são removidas do vacúolo parasitóforo e esse processo bioquímico modifica as características desse vacúolo impedindo a fusão com lisossomos ou qualquer vesícula do sistema endolisossomal. Além dessa função, a secreção dos grânulos densos também auxilia na formação de complexa rede de túbulos que é formado a partir da membrana do vacúolo parasitóforo e se projeta para dentro do lúmen vacuolar (Delauw et al., 2005). Essa rede tem se apresentado como principal suporte de interação entre o parasito e a

célula hospedeira, o que favorece o parasito na captação de nutrientes e principalmente lipídeos como o colesterol (Black e Boothroyd, 2000). A mitocôndria da célula hospedeira está intimamente ligada ao vacúolo parasitóforo contribuindo para a utilização do metabolismo do hospedeiro pelo parasito.

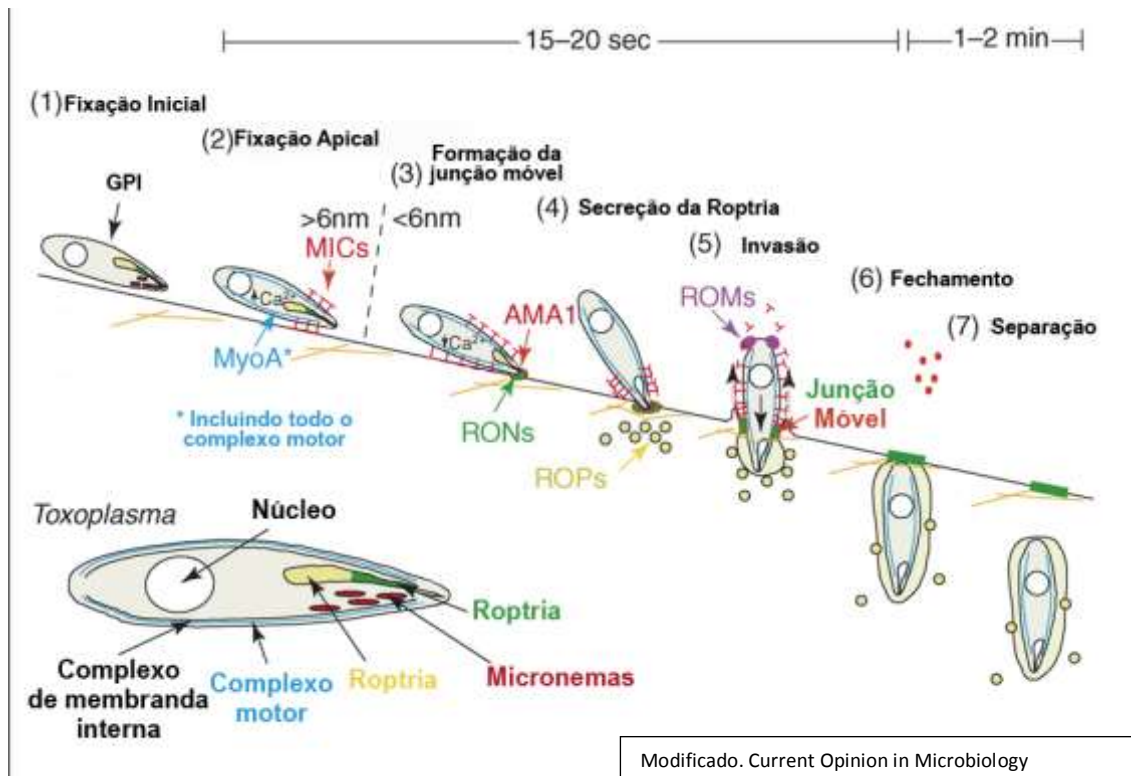


Figura 3. Modelo integrado de invasão de *Toxoplasma gondii*. A figura apresenta o processo de entrada do parasito em sete etapas: (1) Fixação, (2) Fixação Apical, (3) Formação da Junção Móvel, (4) Secreção da Roptria, (5) Invasão, (6) Fechamento e (7) Separação. Durante todo o processo há reconhecimento de moléculas importantes, formação da junção móvel, e separação do parasito da membrana plasmática formando o vacúolo parasitóforo. Fonte: Adaptado de Carruthers e Boothroyd (2007).

1.3 - Resposta Imunológica deflagrada pelo *Toxoplasma gondii*

A invasão do epitélio marca o início da infecção e o início da fase aguda. Já existem muitos artigos caracterizando esse momento, entretanto, ainda há muitos acontecimentos para serem descritos. A transferência transepitelial do parasito é fundamental para a infecção de células dendríticas ou macrófagos. A infecção dessas células sendo usadas como “cavalo de troia” abre o caminho para o parasito a todo o organismo. O fenômeno de cavalo de troia aplicado, é atribuído ao fato do *T. gondii* infectar e se instalar nessas células e as usarem para o acesso à outras células e aos órgãos. Uma vez que macrófagos são células itinerantes e desempenham função na defesa do indivíduo, elas possuem grande acesso ao corpo e disseminam assim o parasito pelo hospedeiro (Barragan e Hitziger, 2008; Bierly et al., 2008). O poder de invadir ativamente as células nucleadas, contribui para a complexidade das interações parasito-hospedeiro através da modulação direta da resposta imune do hospedeiro (Barragan e Hitziger, 2008; Denkers et al., 2008).

Miller e colaboradores (2009) revisaram as vias de regulação e a sinalização da resposta imune mediada por *T. gondii* (Miller et al., 2009). As células do epitélio do hospedeiro quando infectadas liberam quimiocinas, atraindo células da resposta imune inata.

O início da infecção é marcada pela chegada de neutrófilos, essa célula fagocítica reduz muito a carga de parasitos no sítio da infecção (Lima et al., 1998; Blin et al., 2001). Outras células que exercem papel importante na fagocitose dos parasitos são os macrófagos e as células dendríticas. Elas possuem alguns receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), essas moléculas têm sido descritas no processo de resposta inicial contra *T. gondii*, TLR2 e TLR4 são reconhecedoras da ancora GPI do parasito e TLR11, ausente em macrófagos de humanos, reconhecem a profilina liberada pelo parasito (figura 4) (Yarovinsky, et al., 2005; Gazzinelli e Denkers, 2006). São essas células fagocíticas que secretam IL-12 assim como IL-18, promovendo a ativação de células naturais killers (NK e NKT). O reconhecimento de antígenos parasitários pelos PRRs leva a uma exacerbação da atividade fagocítica com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Murray et al., 1985; Adams et al., 1990; Schariton-Kersten et al., 1997).

A resposta imunológica é amplificada pela ativação de outros macrófagos frente a liberação de fator de necrose tumoral (TNF-alfa) por macrófagos estimulados via IL-12 e IFN-gama. (Adams et al., 1990; Scharon-Kersten et al., 1997).

A resposta imunológica visa a proteção do corpo, sendo assim há uma série de respostas que podem atuar contra o agente deflagrador, mas também contra o próprio tecido. Essa ação contra o próprio tecido pode causar danos no hospedeiro. A resposta desencadeada pelo parasito *T. gondii* apresenta então limitantes. O primeiro é uma resposta muito forte do tipo Th1, isso causa grave inflamação, resultando em danos no tecido intestinal do hospedeiro (Liesenfeld, 2002). Sendo assim é necessário então uma regulação negativa, papel que é realizado pelas interleucina 10 (IL-10) e pelo fator de transformação e crescimento (TGF-beta), ambos atuam modulando a ativação das células do sistema imunológico como os próprios macrófagos (figura 4) (Mosser, 2003).

Outro limitante é a adaptação que *T. gondii* desenvolveu evolutivamente de induzir o sistema imune do hospedeiro de modo que facilite o sucesso da infecção, e persistindo assim ao longo da vida nos tecidos do hospedeiro. Para conseguir tal progresso na infecção, o parasito usa a proteína ROP 16, secretada pela roptria, para fosforilar STAT 3 e STAT 6 (Laliberte e Carruthers, 2008; Saeij et al., 2007), o produto dessa interferência leva a regulação negativa de IL-12 secretada pelos macrófagos e posteriormente IFN-gama (Kim L, 2004). Interessante é que essa característica regulatória não é comum a todas as cepas, sendo somente presente nas cepas tipo I e III (Saeij et al., 2006; Saeij et al., 2007).

Com o que se conhece hoje da relação do parasito com o sistema imune, pode-se mensurar que seriam os fatores que modulam a resposta imune diante do parasito que explicariam em parte a gravidade deflagrada pela infecção por cepas tipo I, e não por cepas do tipo II. Uma vez que as cepas do tipo II, não respondem com eficácia a resposta do hospedeiro como a cepa tipo I responde, a cepa II teria sua multiplicação limitada e isso resultaria em seu encistamento nos tecidos. Essa relação com entre hospedeiro e parasito que asseguram tanto a sobrevivência do hospedeiro quanto a persistência do parasito.

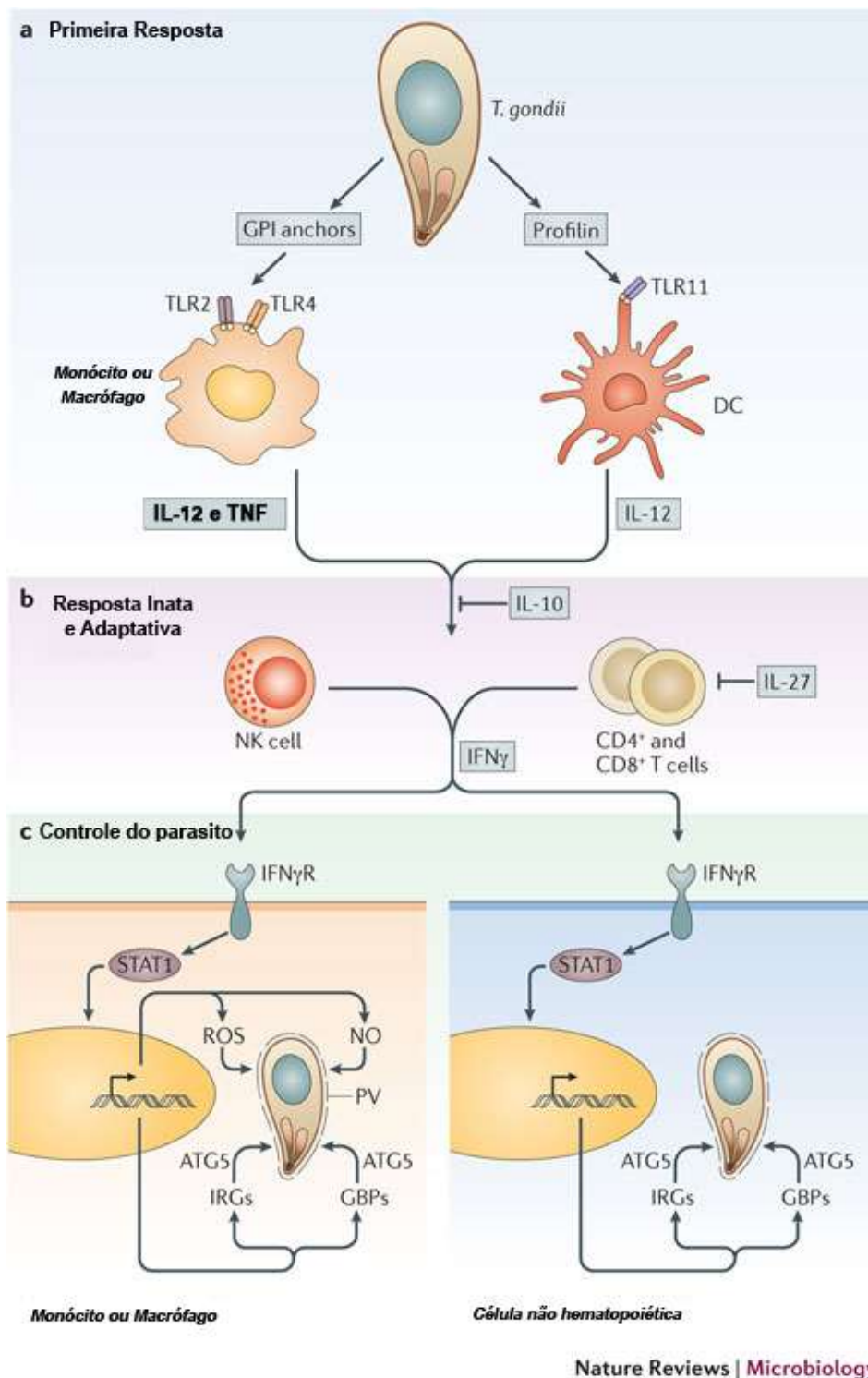


Figura 4. Resposta imune inata de *Toxoplasma gondii* durante a infecção. A) Primeira resposta. A molécula GPI desempenha papel crucial para a montagem da resposta imune inicial. B) Resposta imune inata e adaptativa. Após o reconhecimento da GPI pela família Toll o macrófago produz citocinas que induzem a resposta imune adaptativa. C) Controle contra o parasito. Por fim o controle do parasito envolve STAT 1, ativado pelo reconhecimento de IFN-gama fruto da resposta adaptativa. Fonte: Adaptado de Hunter e Sibley (2012).

Trabalhos publicados recentemente demonstram que *Toxoplasma gondii* pode inibir mecanismos apoptóticos da célula infectada com antagonistas de caspase 8 (Vutova et al., 2007) e interferindo na via do NF-κB (Laliberte e Carruthers, 2008). Dessa forma, evita a eliminação das células infectadas com taquizoítos de *T. gondii* garantindo maior tempo de vida aos bradizoítos nos cistos (Laliberte e Carruthers, 2008).

1.4 - *Toxoplasma gondii* e a relação com os lipídeos da célula hospedeira

Diante do grande potencial de se reproduzir na célula hospedeira (taquizoítos), e assim necessitar sintetizar membrana para novos parasitos, foi sugerido por Sibley e Charron (2002) a possível dependência da maquinaria lipídica da célula hospedeira. Fato esse confirmado, revelando então que o *Toxoplasma gondii* não é capaz de sintetizar colesterol, lipídio necessário para síntese de membrana durante a replicação (Charron e Sibley, 2002). Esse parasito recruta, das células hospedeiras, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade para a síntese de ésteres de colesterol que é armazenado em corpúsculos lipídicos (CL) de *T. gondii*.

Resultados recentes revelam que a depleção de colesterol esterificado por meio de agentes farmacológicos nas células hospedeiras prejudica diretamente a sobrevivência do parasito na célula (Portugal *et al.*, 2009; Nishikawa *et al.*, 2005; Charron e Sibley, 2002).

O mecanismo de captura do colesterol da célula hospedeira pelo *T. gondii* ganhou a contribuição do trabalho de Lige e colaboradores (2013). O grupo observou a presença de uma proteína associada ao retículo endoplasmático TgACAT, essa proteína que possui suas funções associadas a molécula homóloga ACAT da célula hospedeira, se revelou como fundamental para a captura do colesterol da célula hospedeira e o armazenamento desse lipídeo em CL do próprio parasito. A deleção dessa molécula no *T. gondii* ou mesmo uma disfunção da ACAT na célula hospedeira são capazes de prejudicar substancialmente a formação de novas membranas e reduzir a quantidade de corpúsculos no parasito (Lige et al., 2013).

A depleção de colesterol esterificado por meio de agentes farmacológicos nas células hospedeiras prejudica diretamente a sobrevivência do parasito na célula (Portugal *et al.*, 2009; Nishikawa *et al.*, 2005; Charron e Sibley, 2002). O CL,

portanto, tem papel importante na homeostase lipídica desse parasito (Charron e Sibley, 2002).

1.5 – Corpúsculo Lipídico

Os corpúsculos lipídicos (CL) ou adipossomos são organelas citoplasmáticas ricas em lipídios (Mc Gookey & Anderson R. G, 1983), e se apresentam em pequenas quantidades em células de animais, vegetais, bactérias e leveduras (Bozza *et al.*, 2009; Bozza *et al.*, 1997; Bozza *et al.*, 2007; Murphy 2001). Em repouso, células do sistema imune como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, apresentam baixa quantidade de CL. Essa organela sofre um aumento significativo, em número e em tamanho, nestas células quando há sinal de inflamação ou infecções dos tipos clínico e experimental, e em condições neoplásicas. Esse aumento, tanto em número quanto no volume do CL, também é observado em inflamações como: sepse bacteriana (Pacheco *et al.*, 2002), inflamação alérgica pulmonar (Dvorak *et al.*, 1984; Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005), artrite (Bozza *et al.*, 1996); aterosclerose (Portugal *et al.*, 2009; McGookey e Anderson, 1983; Ross, 1995), e em infecções por: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* (Melo *et al.*, 2006; 2005; 2003; Mattos *et al.*, 2010, Tanigawa *et al.*, 2008), *Trypanosoma cruzi* (D'Avila *et al.*, 2011; 2008a), *Plasmodium falciparum* (Jackson *et al.*, 2004), *Plasmodium berghei* (Rodriguez-Acosta *et al.*, 1998), *Leishmania amazonensis* (Pinheiro *et al.*, 2009), dengue vírus (Samsa *et al.*, 2009), vírus da hepatite C (McLauchlan, 2009; Barba *et al.*, 1998), entre outros. O processo inflamatório também é o ponto de partida para um aumento significativo do número de CL em células endoteliais (Bozza *et al.*, 2009).

Corpos lipídicos possuem uma estrutura que consiste em um núcleo de lipídios neutros de triacilglicerol, ésteres de colesterol e diacilglicerol, cercado por uma monocamada lipídica de constituição variada e complexa de fosfolipídios e ácidos graxos (Bartz *et al.*, 2007; Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Murphy 2001) (Figura 5). Além de lipídios, essa organela também possui uma gama de proteínas, dentre elas proteínas estruturais presentes na superfície dos CL. Essas proteínas estruturais pertencem à família PAT (perilipinas, ADRP - *adipose differentiation related protein* ou adipofilina e TIP 49 - *tail interacting protein49*). Essas proteínas estão envolvidas na biogênese, maturação e estrutura do corpúsculo (Brasaemle *et al.*, 1997; 2007; Heid *et al.*, 1998; Londos *et al.*, 2005). Outras proteínas estão presentes nesta

organela como caveolina, proteínas da família Rab (Martin *et al.*, 2005; Fujimoto *et al.*, 2001) (Figura 5), enzimas formadoras de eicosanóides como a Cox-2 (Dvorak *et al.*, 1993; Bozza *et al.*, 1997), PI3 quinase (fosfatilinositol 3 quinase), MAP quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases*)(Yu *et al.*, 1998; 2000; Chen *et al.*, 2002), dentre outras (Bozza *et al.*, 2009) (Figura 5).

Os mecanismos envolvidos na biogênese dos CL ainda são controversos. Alguns modelos de gênese de CL têm sido propostos, e a maioria envolve a membrana do retículo endoplasmático (RE) (figura 6). Na figura 6 são destacados 3 modelos. No modelo A, lipídios se acumulam entre as membranas do RE e alcançando determinada massa se desprendem por brotamento gerando o CL. O modelo B é baseado na imunomarcagem de ADPR, proteína encontrada na membrana do RE e também em CL; entretanto esse modelo defende a gênese do CL ao longo da membrana do RE e não dentro do RE. E finalmente, o modelo C propõem que ocorre um acúmulo de proteínas trans-membrana, características de CL e envolvidas no metabolismo de lipídios, no RE dando origem aos CL (figura 6).

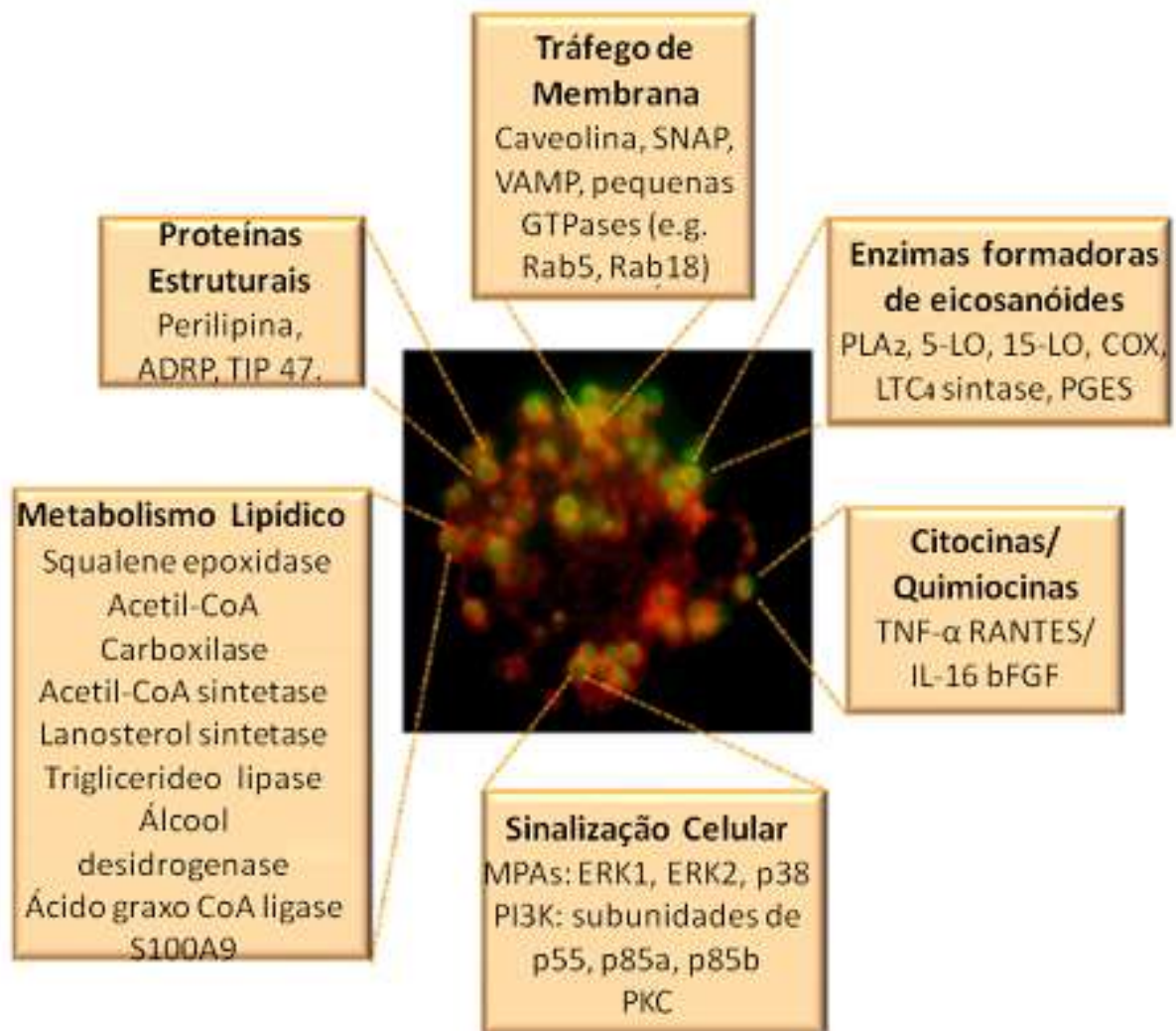


Figura 5. Composição lipídica e protéica de CL. Estão representados na figura as principais enzimas, proteínas e lipídeos de CL. Essas descobertas expandiram as funções atribuídas a essa organela. Fonte: Adaptado de Bozza *et al.* (2009).

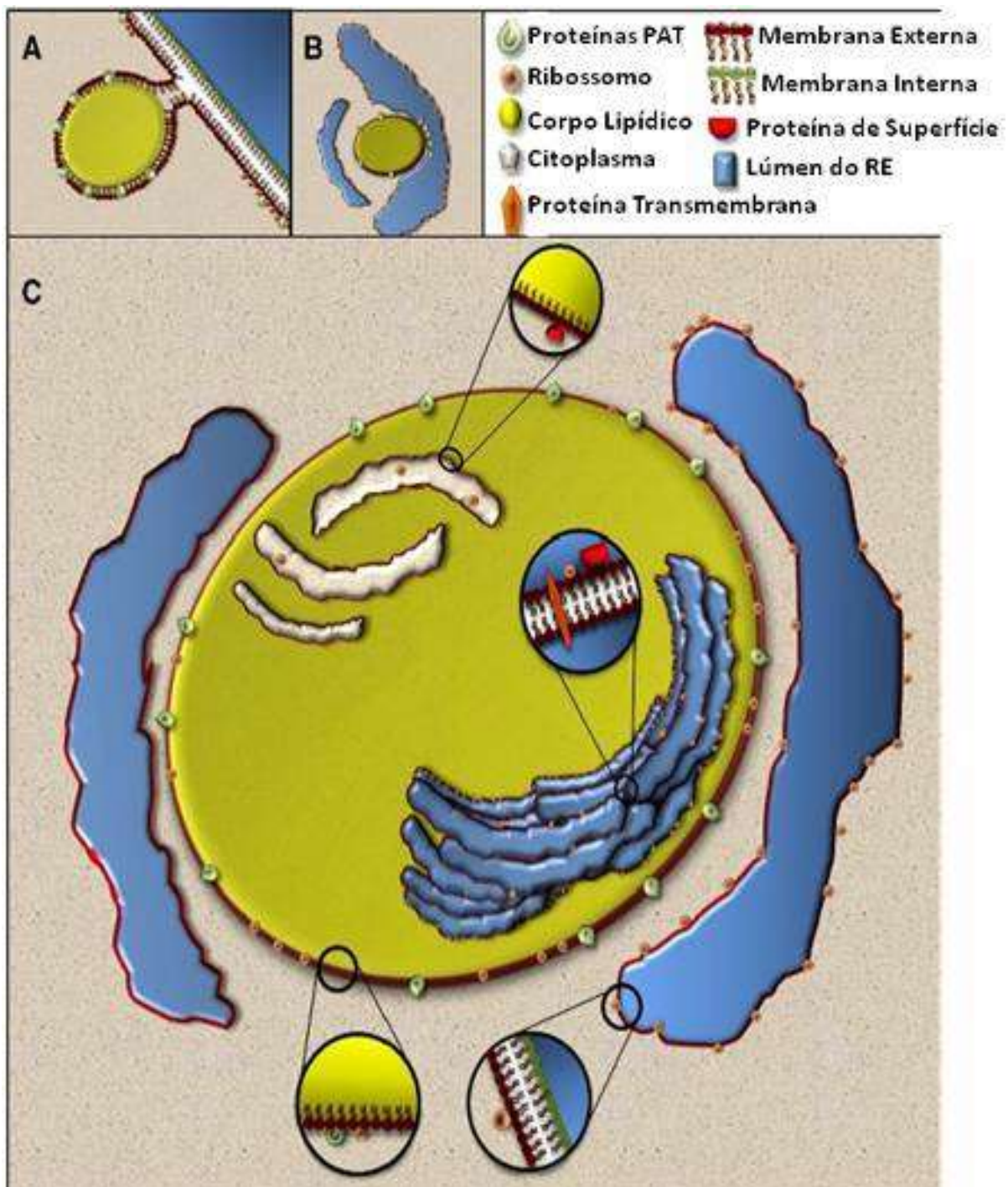


Figura 6. Modelos de gênese de corpúsculo lipídico (CL). (A) Modelo que propõem o surgimento do CL entre membranas do RE. (B) Surgimento do CL ao longo do RE. (C) Acúmulo de proteínas trans-membranas envolvidas no metabolismo de lipídios dando origem ao CL. Fonte: Adaptado de Bozza *et al.* (2009).

Durante muitos anos acreditou-se que CL exerciam apenas a função de reserva lipídica nas células (Weller e Dvorak, 1994). Entretanto a descoberta de algumas proteínas e enzimas na membrana do CL possibilitou possíveis novas funções exercidas por essa organela, não se limitando apenas a de armazenagem lipídica, mas também a de participação na sinalização, metabolismo, tráfego celular e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza *et al.*, 2009). Além destas funções, estas organelas são sugeridas como participantes na apresentação cruzada de antígenos (Bougnères *et al.*, 2009; Bozza *et al.*, 2009). Em *Schistosoma mansoni* foram encontradas grandes quantidades de CL sendo expelidos junto com a saliva, sugerindo a participação do CL, presente nesse parasito, na desintoxicação de heme devido à alimentação do mesmo pelo sangue do hospedeiro (Correa *et al.*, 2007). Apesar da existência de vários estudos sobre o CL nos últimos anos, suas funções ainda não estão completamente elucidadas.

O cultivo de leucócitos com ácidos graxos insaturados (Bozza *et al.*, 1996; Bozza *et al.*, 2009), lipoproteínas (McGookey e Anderson, 1983; Bozza *et al.*, 2009), mediadores lipídicos como PAF (fator de ativação plaquetária) (Bozza *et al.*, 1997), hormônios como leptina e resistina (Xu *et al.*, 2006; Maya-Monteiro *et al.*, 2008), citocinas como IL-5 e IL-12 (Bozza *et al.*, 1998) e as quimiocinas CCL2, CCL5, CCL11, CCL24, CCL26 são alguns dos indutores de disparo da geração destes corpúsculos (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de corpúsculo lipídico em leucócitos é dependente de estímulos e do tipo celular

Estímulo	Tipo celular
Ácido graxo	Neutrófilo,
Ácido graxo insaturado	eosinófilo, monócito/macrófago
Lipoproteínas	
Ac-LDL, E-LDL, AGE-LDL, Ox-LDL.	Macrófago
Moléculas derivadas de patógeno	
LPS/LAM	Macrófago, neutrófilos
Mediadores Lipídicos	Macrófago,
PAF, não lisoPAF	neutrófilos,
5-HETE	eosinófilo
PDE2	Neutrófilo Eosinófilo
Hormônios	
Leptina, resistina	Macrófago
Citocinas/Fator de crescimento	
IL-5, GM-csf, IL-16	Eosinófilo
Quimiocinas	
CCL5/CCL11/CCL24/CCL26	Eosinófilo
CCL2	Macrófago

Fonte: Adaptado de Bozza *et al.*,(2009).

O processo de disparo e o detalhamento dos mecanismos moleculares envolvidos na biogênese de CL têm sido intensamente investigados. Alguns resultados mostram que esses fenômenos são altamente regulados (Bozza *et al.*, 2009; Bozza *et al.*, 2007).

Estudos recentes têm demonstrado que havendo uma sinalização específica, a quantidade de CL pode ser fortemente aumentada conforme a tabela 1 (Bozza *et al.*, 2010; Bozza *et al.*, 2009; Dvorak *et al.*, 1983). Uma das vias de sinalização que controla o aparecimento de CL envolve receptores de membrana membros da

família de *Toll-like* (TLR) em vertebrados (D'Avila *et al.*, 2008a; Pacheco *et al.*, 2002). Os TLRs têm sido apontados como importantes receptores de reconhecimento de padrão de ampla gama de patógenos, incluindo, bactérias, vírus, fungos e protozoários, sendo cruciais para a sinalização celular (Kaisho e Akira, 2003). TLR-4 é expresso em grande variedade de células de vertebrados e funciona como molécula de reconhecimento primário de lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas. LPS, dentre outros indutores (tabela 1), dispara a formação de CL em macrófagos e foi demonstrado que esse mecanismo é altamente dependente de TLR-4 para este fenômeno (Pacheco *et al.*, 2002).

Pesquisas com células infectadas *in vitro* com *Micobacterium bovis* e *T. cruzi* revelaram aumento de CL nas células hospedeiras (D'Avila *et al.*, 2008a; Melo *et al.*, 2006; 2005; 2003). Na infecção de leucócitos com *M. bovis*, o aumento de CL foi claramente acompanhado por maior produção de prostaglandina. Entretanto quando o experimento foi feito com *M. smegmatis*, parasito não patogênico para indivíduos saudáveis, não houve modulação positiva de CL. Experimentos com o sangue de ratos infectados com *T. cruzi* revelaram que leucócitos circulantes em sangue periférico estavam repletos de CL, quando comparados com indivíduos e ratos saudáveis (D'Avila *et al.*, 2008a). O controle da geração do CL nessas interações está relacionado com diversos fatores entre eles o tempo de interação, e a relação parasito-macrófago (D'Avila *et al.*, 2006). Esse processo de aparecimento de CL pode ser amplificado por citocinas e quimiocinas geradas pela própria inflamação (Pacheco *et al.*, 2002).

A infecção de hemácias com *Plasmodium falciparum* também foi capaz de aumentar o número de CL nas hemácias (Jackson *et al.*, 2004). O mesmo evento foi observado em hepatócitos de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (Rodriguez-Acosta *et al.*, 1998).

Macrófagos que interagem com neutrófilos apoptóticos também apresentam aumento no número de CL, entretanto a interação dos macrófagos com neutrófilos necróticos não foi capaz de induzir aumento no número dessa vesícula (D'Avila *et al.*, 2008b). Ademais, grande número de neutrófilos recrutados para locais infectados por BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) entram em apoptose (D'Avila *et al.*, 2008b), e quando fagocitados por macrófagos induzem a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂), TGF-beta e a formação de CL (D'Avila *et al.*, 2008b).

D'Avila e colaboradores demonstraram em 2011 que a infecção de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos induz aumento nas organelas lipídicas da célula hospedeira. Essa indução é dependente do receptor 2 da família Toll-Like. Além da indução direta do parasito há também a potencialização das organelas lipídicas frente a neutrófilos apoptóticos que servem como “cavalos de troia” para parasitos internalizados. O grupo também demonstrou que o uso de C75 (inibidor de síntese de ácido graxo) na inibição de CL reverteu os efeitos de células apoptóticas na síntese da organela lipídica, síntese de eicosanoides, e a replicação do parasito. O conjunto desses resultados indicam que os CL são regulados durante a infecção por *T. cruzi* e estão potencialmente envolvidos como mecanismo de escape na infecção pelo parasito (D'Avila et al., 2011).

1.6 – Regulação da Apoptose e Mimetismo Apoptótico

A morte celular programada por apoptose de células desgastadas ou mesmo células que apresentam um potencial nocivo ao organismo multicelular é descrito como um mecanismo benéfico ao organismo (Vaux e Korsmeyer, 1999). O sucesso desse processo para remoção de células é devido a ausência de reação inflamatória (Savill e Fadok, 2000). Uma das características fenotípicas de células apoptóticas é a exposição de fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática, o que permite o seu reconhecimento por fagócitos e inibe a reação inflamatória (Vaux e Strasser, 1996; Fadok et al., 2001). O reconhecimento de PS induz a liberação de TGF-beta, citocina antiinflamatória importante para a supressão de resposta inflamatória de macrófagos (Fadok et al., 2001).

Em organismos unicelulares como leveduras (Frolich e Madeo, 2000) e tripanosomatídeos (Moreira et al., 1996; Shaha et al., 2001; Dos Reis e Barcinski, 2001), a morte celular tem sido descrita como benéfica num sistema de população clonal. Marcello Barcinski e colaboradores propuseram em 2001 que *Leishmania* spp. são capazes de evadir a atividade dos fagócitos estabelecendo-se como intracelulares obrigatórios. A forma infectiva de amastigotas expõe PS se assemelhando a células apoptóticas e inibindo a atividade microbicida dos macrófagos. Foi demonstrado por esse grupo que essa exposição da PS participa na interiorização do amastigota e o reconhecimento do fosfolípido induz a secreção de TGF-beta e IL-10. Essas citocinas inibiram a produção de NO, e permitiu o

crescimento intracelular de *Leishmania* (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006; Wanderley et al., 2010; Wanderley e Barcinski, 2010).

Assim com os tripanosomatídeos *Leishmania amazonensis* (Wanderley et al., 2006; Zandbergen et al., 2006) e *Trypanosoma cruzi* (DaMatta et al., 2007), o apicomplexa *T. gondii* (Seabra et al., 2004) também expõem PS na membrana plasmática. O conceito de fato de mimetismo apoptótico em parasitos tripanosomatídeos veio pelos importantes estudos apresentados em *Leishmania sp.* *Toxoplasma gondii* expõe PS e induz a produção de TGF-beta em macrófagos (Seabra et al., 2004). Esse mecanismo de exposição de PS tem sido estudado como uma forma de auxiliar os mecanismos de escape do parasito em macrófagos ativados (Seabra et al., 2004) e tem se revelado como ponto chave na entrada do parasito na célula hospedeira e o sucesso da infecção (Wanderley & Barcinski, 2010; Wanderley et al., 2009; Wanderley et al., 2006; Zandbergen et al., 2006; Santos et al., 2011). Em recente publicação, Santos e colaboradores (2011) mostraram que *T. gondii* possui aproximadamente 50% de seus parasitos expondo PS na face externa da membrana plasmática. A exposição de PS por esses parasitos não pode ser relacionada com morte celular por apoptose, uma vez que são os PS + que entram ativamente na célula parasitada, são capazes de se multiplicar, e inibem a produção de NO da célula hospedeira, progredindo assim a infecção (Santos et al., 2011).

Apesar de todo esse conhecimento apresentado, da relação de *T. gondii* com os lipídios da célula infectada, o seu próprio acúmulo de CL, e sua exposição de PS na membrana como forma de mimetismo apoptótico, da capacidade de outros parasitos apicomplexa e células apoptóticas induzem CL na célula hospedeira. Ainda não está completamente elucidado se a simples infecção por esse parasito é capaz de gerar CL na célula hospedeira, se a PS exposta pelo parasito é suficiente e única no processo de biogênese de CL nas células hospedeiras, se as citocinas geradas pela infecção por *T. gondii* participam ou mesmo amplificam o aumento das vesículas lipídicas.

2 - Objetivos

2.1 - Geral

Investigar a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos frente à interação com *Toxoplasma gondii*.

2.2 - Específicos

Verificar se a interação de *T. gondii* com o macrófago é capaz de induzir corpúsculos lipídicos na célula hospedeira.

Verificar se há diferença no número de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com diferentes cepas de *T. gondii*.

Verificar a participação da fosfatidilserina, presente na membrana do parasito, na indução de corpúsculos lipídicos em macrófagos.

Investigar o papel da TGF-beta na indução de corpúsculos lipídicos durante a interação entre o *T. gondii* e o macrófago.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Reagentes

3.1.1 - Anexina-V-beads/ Anexina-V-FitC/ Anexina V purificada

A anexina conjugada com microesferas foi utilizada na separação do parasito com a presença da fosfatidilserina (PS+) (Miltenyi Biotec). Já a anexina V- FitC, marcador florescente do fosfolipídio, foi utilizada para a confirmação da separação das populações positivo ou negativo de PS (BD Biosciences) essa marcação foi adquirida no citômetro de fluxo (calibur BD). E por último a anexina V purificada foi utilizada para neutralizar a PS na membrana dos parasitos (BD biosciences).

3.1.2 – Lipossomos

Os lipossomos foram cedidos gentilmente pelo Dr. Marcelo Barcinski. Foram utilizados dois grupos de lipossomos, lipossomos com fosfatidilcolina (PC) na concentração de 25mM/ml e lipossomos com PS na mesma concentração. O veiculo utilizado para solver os lipossomos foi água para injeção.

3.1.3 – Anti-TGF-beta (Fator de transformação do crescimento)

Os anticorpos anti-TGF-beta foram utilizados para verificar a participação dessa proteína na indução de CL. O neutralizante foi adquirido da fabricante R&D System. A concentração recomendada pelo fabricante para a neutralização é de 0,6µg/ml. (Catalog number:AB-101-NA).

3.2 – Células

3.2.1 – Macrófagos de medula óssea

Células de medula óssea foram obtidas a partir de lavado de fêmur de camundongos C57BL/6 com RPMI 1640 (Sigma, St. Louis-MO, USA) e colocadas num tubo (Falcon). Utilizando a pipeta Pasteur de plástico foram desfeitos os grumos de células, e estas foram contadas em câmara de Neubauer. Foi semeado 4×10^6 de células por placa de petri plástica e adicionado 10ml de meio BMM [RPMI 1640 suplementado com 30% de meio condicionado por células L929, 20% de SFB (Soro Fetal Bovino, Hyclone/LGC), 1% Antibióticos (Penicilina 100 unit/ml e Streptomicina 100 Mg/ml) e 1% L-glutamina (2,05 mM)]. Após três dias de cultivo na estufa (5%

CO₂, 37°C) foi somente adicionado mais 10ml de meio BMM as placas de petri contendo as células. Passados mais 4 dias da adição de meio BMM, ou 7 dias do início da diferenciação as células, foram retiradas da placa de petri por repetidas pipetagens, colocadas num tubo (Falcon), centrifugadas (500g por 10'), ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB ou Nutridoma, 1% antibióticos (Penicilina 100 unit/ml e Streptomicina 100 Mg/ml) e 1% L-glutamina (2,05 mM), contadas na câmara de Neubauer, e semeadas na placa de 24 poços com lamínulas na quantidade de 5.10⁵ células por cada poço. Após 24 ou 48 h, os macrófagos foram lavados com PBS estéril (ph 7,2) e submetidos aos tratamentos, interação com os parasitos ou lipossomos.

3.2.2 – L929

A linhagem de célula L929 é de fibroblastos de camundongos e libera constitutivamente o M-CSF (*Macrophage colony stimulation factor*) que induz o crescimento e diferenciação de células da linhagem de fagócitos mononucleares (Forster et al., 1987). Células L929 foram descongeladas, centrifugadas (500g por 5') e ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Hyclone/LGC), 1% Antibióticos (Penicilina 100units/ml e Streptomicina 100 Mg/ml) e 1% L-glutamina (2,05 mM). Uma alíquota foi retirada para a contagem na câmara de Neubauer e 4 x 10⁶ células por garrafa de cultura de célula (tamanho de 175 cm²) foram semeadas. Foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Hyclone/LGC), 1% Antibióticos (Penicilina 100units/ml e Streptomicina 100 Mg/ml) e 1% L-glutamina (2,05 mM) até completar 25 ml. Após a confluência das células na garrafa, foi adicionado mais 100ml de RPMI suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Hyclone/LGC), 1% Antibióticos (Penicilina 100units/ml e Streptomicina 100 Mg/ml) e 1% L-glutamina (2,05 mM). Sete dias depois o sobrenadante foi coletado, filtrado (0,22 µM), aliquoteado e mantido a -20°C. Esse sobrenadante foi utilizado para a diferenciação de células de medula óssea em macrófagos (meio BMM).

3.3 – Parasitos

3.3.1 – Manutenção

3.3.1.1 – Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* cepa RH

Esta cepa de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss de 3 semanas através de passagens via lavado peritoneal realizado a cada 3 dias. Para experimento, o lavado foi centrifugado a 50g, por 10 min, 4°C, o sobrenadante coletado e novamente centrifugado a 1000g, por 10 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspensão em RPMI 1640 e os taquizoítos contados na câmara de Neubauer (Seabra *et al.*, 2004).

3.3.1.2 – Taquizoítos *Toxoplasma gondii* cepa ME-49

Esta cepa de *T. gondii* foi mantida através da infecção de células VERO mantidas em garrafas de cultura com RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. O parasito foi retirado da garrafa e centrifugado à 1000g por 10 min a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em RPMI 1640 e os parasitos contados na câmara de Neubauer.

3.3.2 – Separação por anexina V-Beads

Foi observado por Seabra e colaboradores (2004) que o *Toxoplasma gondii* possui duas subpopulações, parasitos que expõem PS na membrana e parasitos que não expõem. Então os parasitos foram coletados por lavado peritoneal de camundongos infectados, cepa RH, com tampão de cálcio (Kit Miltenyi Biotec), contados na câmara de Neubauer e 2×10^8 taquizoítos foram incubados com anexina V conjugada a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec), seguindo as indicações do fabricante (Miltenyi Biotec – No. 130-090-201). Após 1 hora, a suspensão de células foi adicionada a uma coluna magnética, retendo os parasitos PS+; e os parasitos PS- foram eluídos. Parasitos PS+ foram retirados da coluna removendo-a do campo magnético e ejetando num tubo (Falcon). As subpopulações foram centrifugadas (1000g por 5') e ressuspensas em PBS estéril (ph 7,3) para a retirada do neutralizante com as microesferas. Novamente os parasitos foram centrifugados (1000g por 5') e ressuspensos em RPMI 1640, mantidas separadas e contadas.

3.4 – Infecção

3.4.1 – RH ou ME-49

Os macrófagos obtidos segundo o item 3.2.1 foram infectados com *T. gondii* cepas RH ou ME-49 obtidos segundo item 3.3.1.1 e 3.3.1.2 por 24 horas na proporção de 1:1. Após o período indicado o sobrenadante foi coletado em eppendorffs e congelados no freezer -20°C para a leitura de citocinas e as células foram lavadas com PBS estéril (ph 7,3), fixadas com formalina (3,7%) por 10' e os corpúsculos lipídicos marcados.

3.4.3 – RH população total/ RH PS positivo (PS+)/ RH PS negativo (PS-)

Os macrófagos obtidos segundo o item 3.2.1 foram infectados com *T. gondii* cepa RH separados por anexina conjugada com microesferas obtidos segundo item 3.3.2 (PS+ e PS-). Uma alíquota dos parasitos foi retirada logo após o lavado peritoneal do camundongo infectado (População Total). Então os macrófagos plaqueados foram infectados separadamente com as três condições, população total, população PS+ e população PS-. Após 24 horas de infecção na proporção de 1:1, o sobrenadante foi coletado em eppendorffs e congelado no freezer -20°C para a leitura de citocinas e as células foram lavadas com PBS estéril (ph 7,3), fixadas com formalina (3,7%) por 10' e os corpúsculos lipídicos marcados.

3.5 – Tratamentos

3.5.1 – Anexina V

Os parasitos obtidos no item 3.3.2 após a centrifugação foram tratados com anexina V purificada (Miltenyi Biotec) para 10^5 parasitos por 100µl de tampão de cálcio (BD biosciences) foi adicionado 10 µl de anexina (50pg/µl). Após 1 hora os parasitos foram colocados para infectar os macrófagos preparados segundo item 3.2.1. na proporção de 1:1. Após 24 horas de infecção o sobrenadante foi coletado em eppendorffs e congelado no freezer -20°C para a leitura de citocinas e as células foram lavadas com PBS estéril (ph 7,3), fixadas com formalina (3,7%) por 10' e os corpúsculos lipídicos marcados.

3.5.2 – Lipossomos

Os macrófagos foram preparados segundo item 3.2.1 e interagidos com lipossomos PS ou lipossomos PC nas seguintes concentrações: 25µM/ml e 50µM/ml e uma mistura de 50% de cada lipossomo formando uma concentração final de 50µM/ml. Após 24 horas de interação o sobrenadante foi coletado em eppendorffs e congelado no freezer -20°C para a leitura de citocinas e as células foram lavadas com PBS estéril (ph 7,3), fixadas com formalina (3,7%) por 10' e os corpúsculos lipídicos marcados, fotografados e quantificados.

3.5.3 – Neutralizante de TGF-β

Os macrófagos obtidos segundo o item 3.2.1 foram infectados com *T. gondii* cepa RH separados por anexina conjugada com microesferas obtidos segundo item 3.3.2 (PS+ e PS-). Uma alíquota dos parasitos foi retirada logo após o lavado peritoneal do camundongo infectado (População Total). Então os macrófagos plaqueados foram submetidos ao pré-tratamento de neutralizante de TGF- β (2µg/ml) e logo após foram submetidos a infecção separadamente com as três condições, população total, população PS+ e população PS- e controle do conjugado do neutralizante IgG. Após 24 horas de infecção na proporção de 1:1, o sobrenadante foi coletado em eppendorffs e congelado no freezer -20°C para a leitura de citocinas e as células foram lavadas com PBS estéril (ph 7,3), fixadas com formalina (3,7%) por 10' e os corpúsculos lipídicos marcados.

3.6 – Marcação, contagem e análise de Corpúsculo Lipídico

3.6.1 – Oil Red O

Oil Red O (ORO) é um óleo vermelho e seu principio é baseado nas suas propriedades físicas, que preferencialmente entra em compartimentos ricos em lipídios. As células submetidas aos experimentos após a fixação foram lavadas com PBS (ph 7,3) e submetidas a três processos. O primeiro foi a incubação com propilenoglicol por 5'. O propilenoglicol do processo 1 foi retirado e 0,5% de ORO em propilenoglicol aquecido à 60°C por 10 minutos. ORO 0,5% foi retirado e propilenoglicol 85% em água destilada foi adicionado por 5'. As células foram lavadas com PBS (ph 7,3). Hematoxilina de Griss foi colocado sobre as células por 2' para a marcação do núcleo da célula e do parasito. Ao fim as lamínulas foram montadas sobre as laminas.

3.6.2 – Bodipy

Bodipy (*4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene*) é uma sonda que cora com eficácia lipídeos neutros principalmente. Alguns experimentos do item 3.4.1 foram fixados, lavados com PBS (ph 7,3) e as células foram incubadas com 1mM de Bodipy por 1 hora a temperatura ambiente. Após o tempo proposto, as células nas lamínulas foram lavadas com PBS (ph 7,3) e montadas em laminas com Prolongold contendo DAPI.

3.6.3 – Análise e Contagem dos Corpúsculos Lipídicos

Os corpúsculos foram analisados em microscopia de campos claro quando corados com ORO e fluorescência quando marcados com Bodipy. Cada experimento independente foi realizado em triplicada, então os corpúsculos foram contados nas células de cada lamínula da triplicata. As contagens foram feitas do seguinte modo: um campo aleatório foi escolhido na objetiva de 40x e todas as células contadas juntamente com seus corpúsculos. O n amostral do experimento era dado então pelas médias dos corpúsculos por células de cada lamínula, dentro dos mesmos tratamentos ou infecções. Quando o campo primeiro escolhido não atingia o numero desejável de células, o campo acima era desse campo inicial era posicionado.

As porcentagens de células foram quantificadas em 100 ou 50 usando a mesma técnica de contagem dos corpúsculos. Um campo aleatório era escolhido e nele eram contados as células que possuíam corpúsculos na presença ou ausência do parasito.

3.7 – Análise Estatística

Foi usado o teste paramétrico ANOVA para a detecção de diferenças entre as médias obtidas, sendo eles classificados com 1, 2 ou 3 asterisco de significância indo respectivamente da menor para a maior diferença: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,001$. Os dados e os gráficos gerados pelos experimentos foram armazenados e analisados pelo programa GraphPad Prism 5.

4 - Resultados

4.1 – A cepa Rh de *Toxoplasma gondii* é capaz de induzir corpúsculos lipídicos independente da cepa.

A interação dos macrófagos com a forma de taquizoítos do *T. gondii* por 1 hora, foi capaz de aumentar o número de CL (Figura 7B) quando comparados a macrófagos que não interagiram com o parasito (Figura 7A). Após quantificação, foi confirmado aumento significativo de CL após interação com o parasito (Figura 7C).

Visando verificar se a geração de corpúsculos lipídicos após a interação da célula hospedeira com *T. gondii* foi cepa dependente, macrófagos foram submetidos a interação com taquizoítos das cepas ME-49 e RH. Observamos que a interação com ambas as cepas foi capaz de induzir CL. Curiosamente não houve qualquer diferença significativa do número de CL nas células submetidas à interação com ambas as cepas (Figura 8).

Para determinar se a geração de CL era dependente da relação parasito macrófago, essas células foram submetidas à interações com diferentes quantidades de taquizoítos. O número de CL aumentou com o aumento de parasitos por células de 2 para 5, visto que de 1 para 2 a diferença é pequena e quando foi usado 10 parasitos a viabilidade da célula diminuiu para 45% (Figura 9).

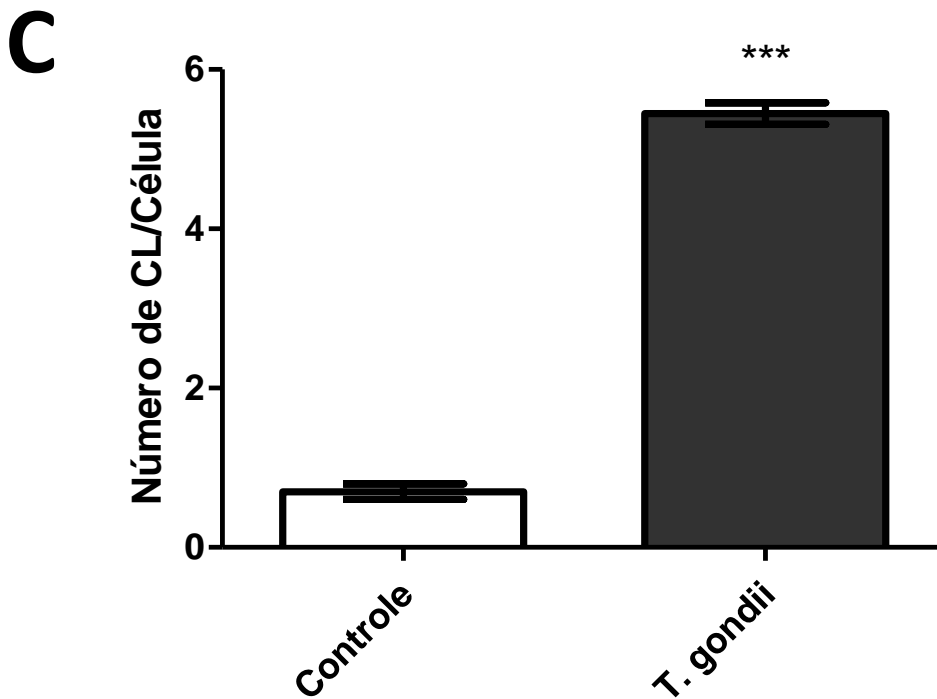
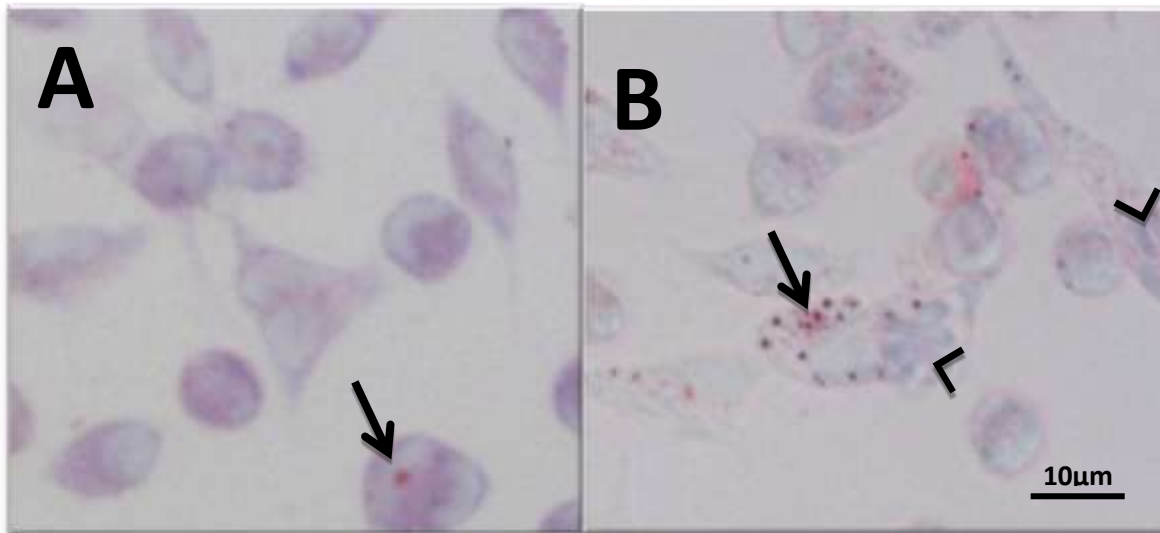


Figura 7 – Biogênese de CL em macrófagos infectados. Macrófagos de medula óssea foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino e foram infectados ou não com a cepa Rh de *T. gondii* na proporção de 1:1 por 24 horas. As células coradas com ORO e os CL foram marcados. Após a marcação com ORO as células foram coradas com hematoxilina. (A), observamos macrófagos sem a infecção de *T. gondii* e o pequeno número de CL. Em B, observamos as células infectadas com o *T. gondii* (cabeça de seta) e o número de CL (seta) na célula aumentado. Em (C) o gráfico representa a quantificação do número de CL por células, e confirmando a imagem temos as células infectadas apresentando maior número de CL em relação ao as células controle sem a infecção. O gráfico é representado pela média de CL com erro padrão. Diferença significativa em relação ao controle, *** $P < 0,001$. Média de cinco experimentos com erro padrão.

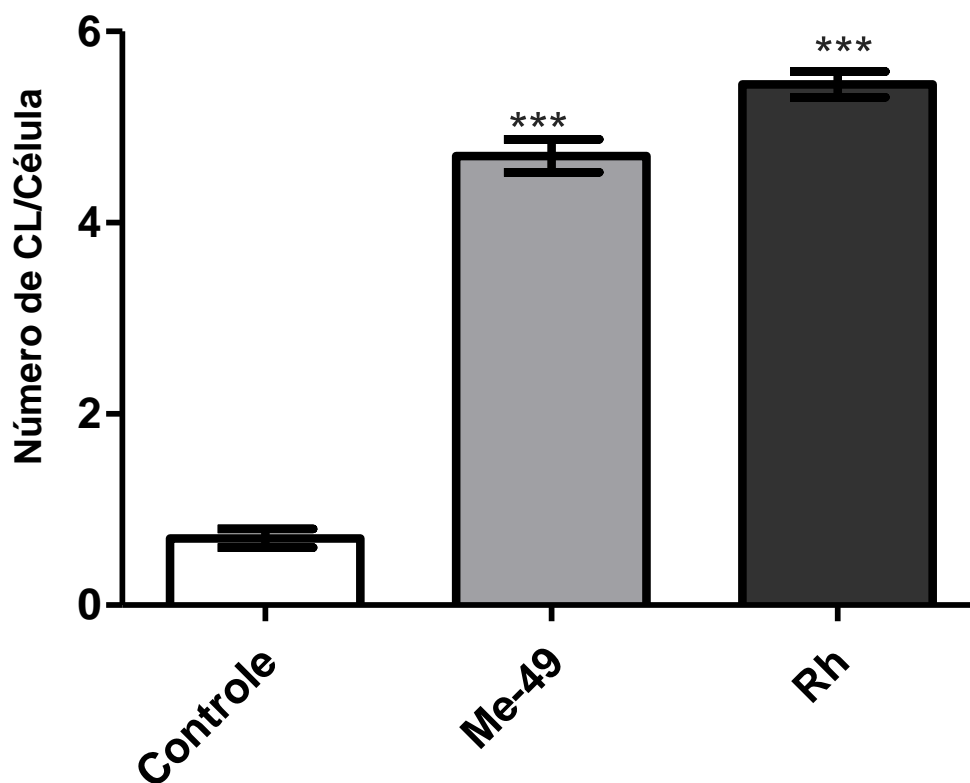


Figura 8 - Biogênese de CL em macrófagos infectados com diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. Macrófagos de medula óssea foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino e foram infectados com a cepa ME-49 ou cepa RH. Nas duas infecções foi utilizado a proporção de 1 parasito para 1 célula e deixados por 24 horas de interação. Os macrófagos foram fixados, os CL corados com ORO e contados. O gráfico representa a média da quantificação do número de CL por células com erro padrão. Diferença significativa em relação ao controle, *** $P < 0,001$. Média de cinco experimentos com erro padrão.

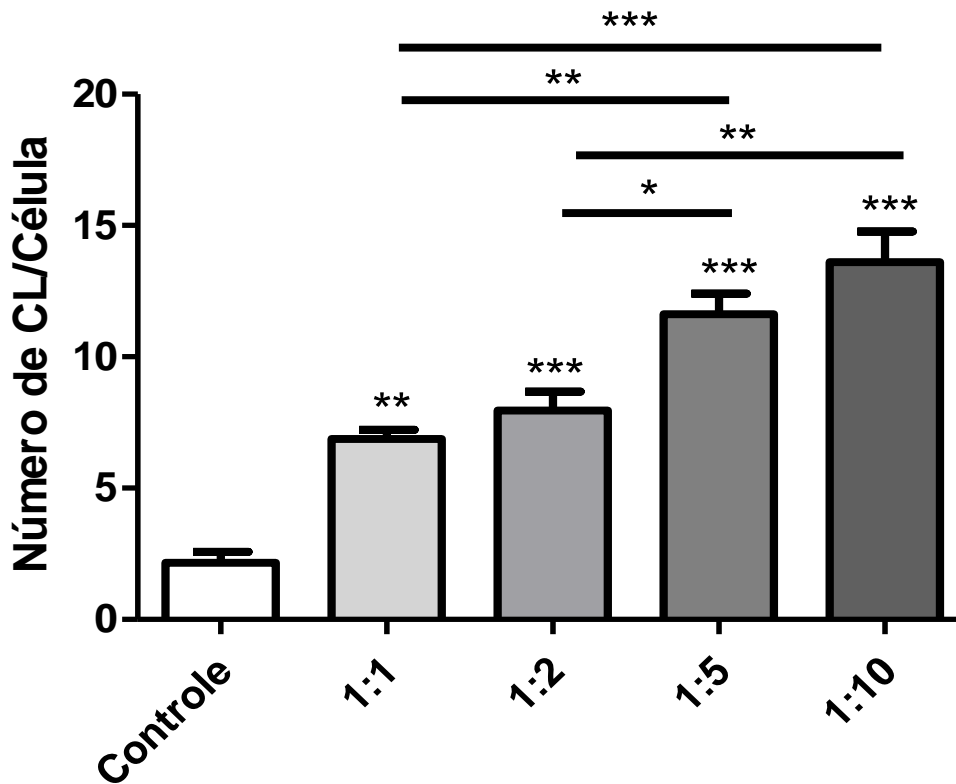


Figura 9 – Relação crescente da quantidade de CL com quantidade de parasitos. Os macrófagos foram plaqueados e cultivados com meio RPMI suplementado com 2% de SFB e infectados com diferentes relações de parasito por célula. *Toxoplasma gondii* foi quantificado e colocado para infectar os macrófagos nas seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10 por 24 horas; macrófagos “controle” não foram infectados. A viabilidade das células foram observadas, somente a proporção 10 parasitos para 1 célula tornou-se inviável. As células foram fixadas e os CL marcados com ORO. O gráfico representa a média com erro padrão de CL por célula. Diferenças significativas em relação ao controle, ** P>0,01; *** P>0,001. Média de três experimentos com erro padrão.

4.2–Confirmação da reprodutibilidade e pureza da separação de subpopulações de PS+ e PS- do *Toxoplasma gondii*

Com o intuito de investigar a participação da PS na indução de CL, a população total de *T. gondii* foi submetida a separação de parasitos PS positivos (PS+) dos PS negativos (PS-) através de coluna magnética após incubação com anexina V conjugada a esferas magnéticas. A separação foi eficiente, visto que apresentou uma média de 90% de pureza para parasitos negativos e 85% para parasitos positivos (figura 10).

4.3 – A população PS+ é capaz de induzir significativamente mais CL

Após a obtenção de uma metodologia para a separação das subpopulações, macrófagos foram infectados com as subpopulação PS-, PS+, e a população total, a fim de observar a indução de CL mediante presença ou ausência do fosfolipídio. A população total de *T. gondii* como já mostrado, foi capaz de induzir a geração de CL nos macrófagos (Figura 11). Como esperado a população PS+ foi capaz de induzir significativamente mais CL do que os macrófagos controle e os que interagiram com a população total (Figura 11). Os resultados indicam que, apesar de não expor PS na membrana plasmática, a subpopulação PS- foi capaz de induzir CL nos macrófagos quando comparados aos macrófagos controle, porém em quantidade menor que os macrófagos que interagiram com a subpopulação PS+ (Figura 11). Esse resultado indica que podem existir outros componentes capazes de induzir CL em macrófagos além da PS.

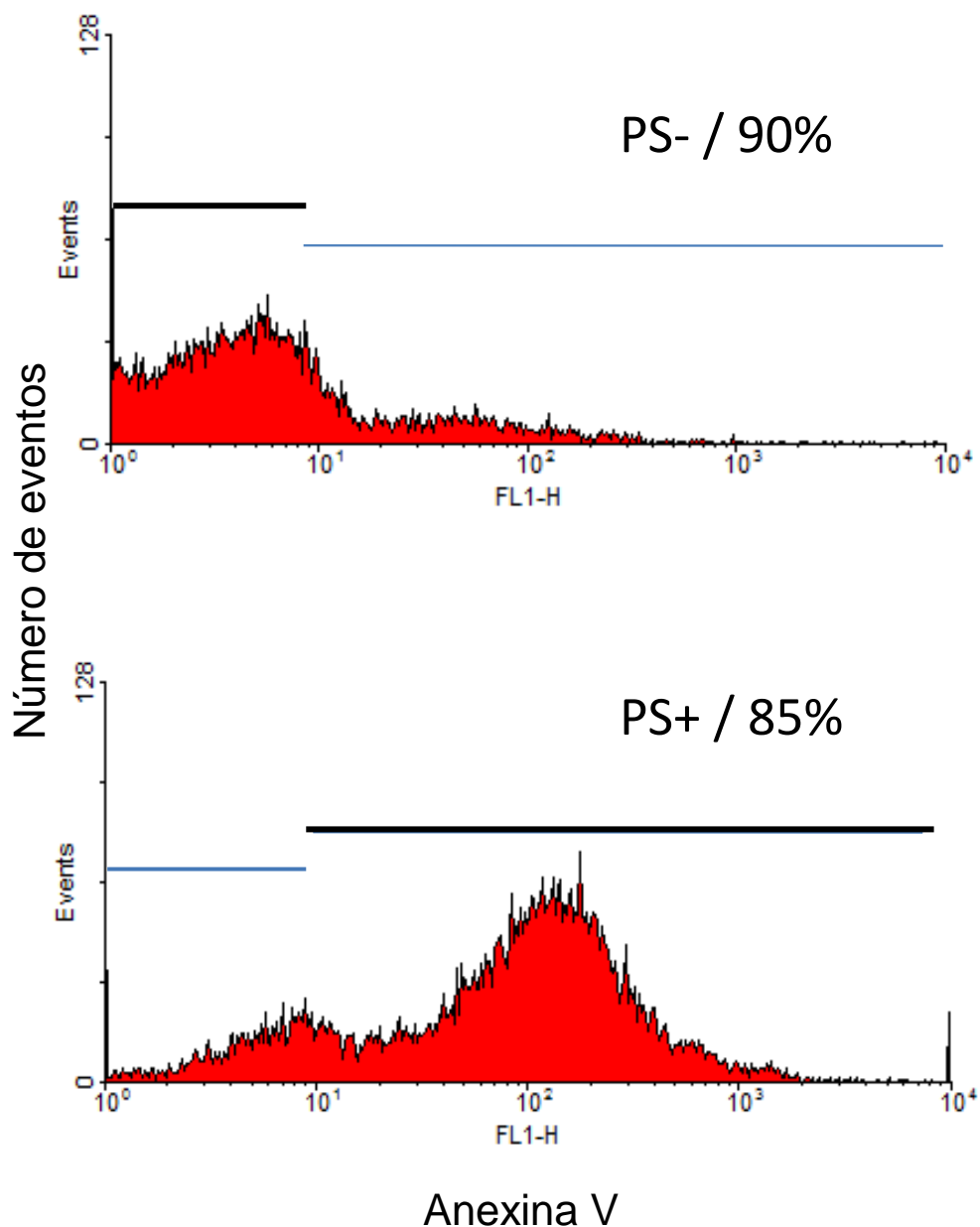


Figura 10 – Verificação de pureza das Subpopulações de *Toxoplasma gondii*, fosfatidilserina positiva (PS+) e fosfatidilserina negativa (PS-). *Toxoplasma gondii* foi mantido em camundongos, e retirado por lavagem peritoneal com tampão de calcio após 3 dias de infecção. Os taquizoítos foram magneticamente separados com anexina V conjugada com microbeads, as subpopulações foram ressuspensas com PBS para retirar a anexina com beads, e novamente neutralizados com anexina V-FITC. Por fim os parasitos foram analisados por citometria fluxo. As linhas pretas representam o controle de parasitas sem anexina V, e as linhas a cinza se referem às subpopulações isoladas. Experimento representativo de três.

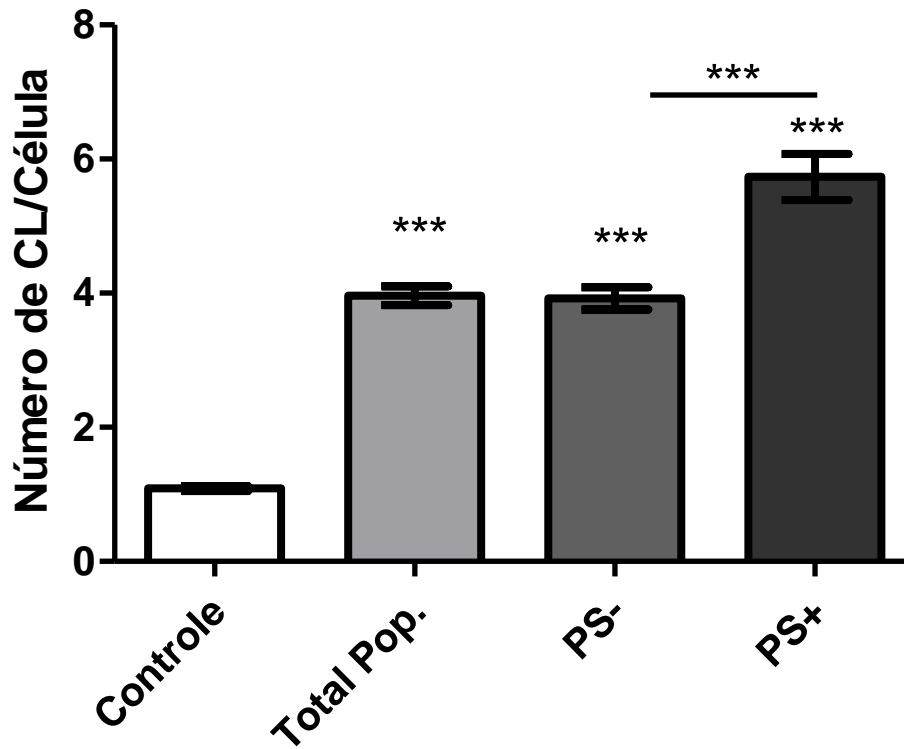


Figura 11 – Indução de corpúsculos pelas diferentes subpopulações de *T. gondii*. Macrófagos foram cultivados com meio RPMI suplementado com 2% de SFB e infectados com diferentes subpopulações de *T. gondii*, população total, população PS+ e população PS-. Após 24 horas de infecção e usando a proporção de 1:1, as células foram fixadas e os CL foram corados com ORO e quantificados. O gráfico representa a média do número de CL por células dos experimentos. Diferenças significativas em relação ao controle, ** P>0,01; *** P>0,001. Média de três experimentos com erro padrão.

4.4 – Participação da PS da membrana do *T. gondii* na indução de CL

Para verificar que a separação magnética não foi capaz de interferir na indução de CL, os parasitos separados em subpopulações PS- e PS+ foram reconstituídos na proporção de 1:1, similar a proporção de parasitos da população total (Seabra et al., 2004). Como não houve diferença significativa entre a população total e a mistura de parasitos PS+ com parasitos PS-, o resultado indica que a separação magnética não foi suficiente para interferir na indução de CL nos macrófagos (Figura 12). As subpopulações separadas e a população total foram capazes de induzir CL como já observado (Figura 12).

Para confirmar a participação da PS do parasito na geração de CL, as subpopulações de PS foram incubadas com anexina-V pura e usadas para interação com macrófagos. A incubação de macrófagos com anexina-V pura não foi capaz de induzir CL (Figura 13). Como esperado, a neutralização da PS dos parasitos PS+ com anexina-V pura foi capaz de reduzir a indução de CL nos macrófagos quando comparados a indução gerada pelos parasitos sem a neutralização (Figura 13). De modo semelhante a população total também teve seu poder indutor reduzido pela neutralização da PS (Figura 13). Os parasitos neutralizados pela anexina-V e os parasitos PS- induziram poucos corpúsculos nos macrófagos, porém ambos ainda significativos quando comparados aos macrófagos controle (Figura 13), esse resultado reforça a ideia de que podem existir outros fatores presentes na infecção por *T. gondii* que estimulam CL.

Para validar a hipótese que PS presente na membrana do parasito induz CL em macrófagos infectados, foram utilizados lipossomos contendo PC (controle) e PS em duas concentrações diferentes (25µg/ml e 50µg/ml) para interagir com macrófagos. Em ambas as concentrações não houve perda da viabilidade da célula após infecção. Os lipossomos contendo PS nas duas concentrações foram capazes de induzir CL (Figura 14). Já os lipossomos controles, contendo somente PC, nas mesmas concentrações não foram capazes de induzir CL significativamente (Figura 14). Uma mistura de 50% de lipossomos PS e PC foram utilizadas para interagir com macrófagos na tentativa de simular a população total de *T. gondii* que apresenta em média 50% da população de parasitos PS+ e 50% de PS- (Seabra et al., 2004). A geração de CL induzido pela mistura de lipossomos atingiu metade da geração induzida por 50 mg de lipossomos PS+ (Figura 14).

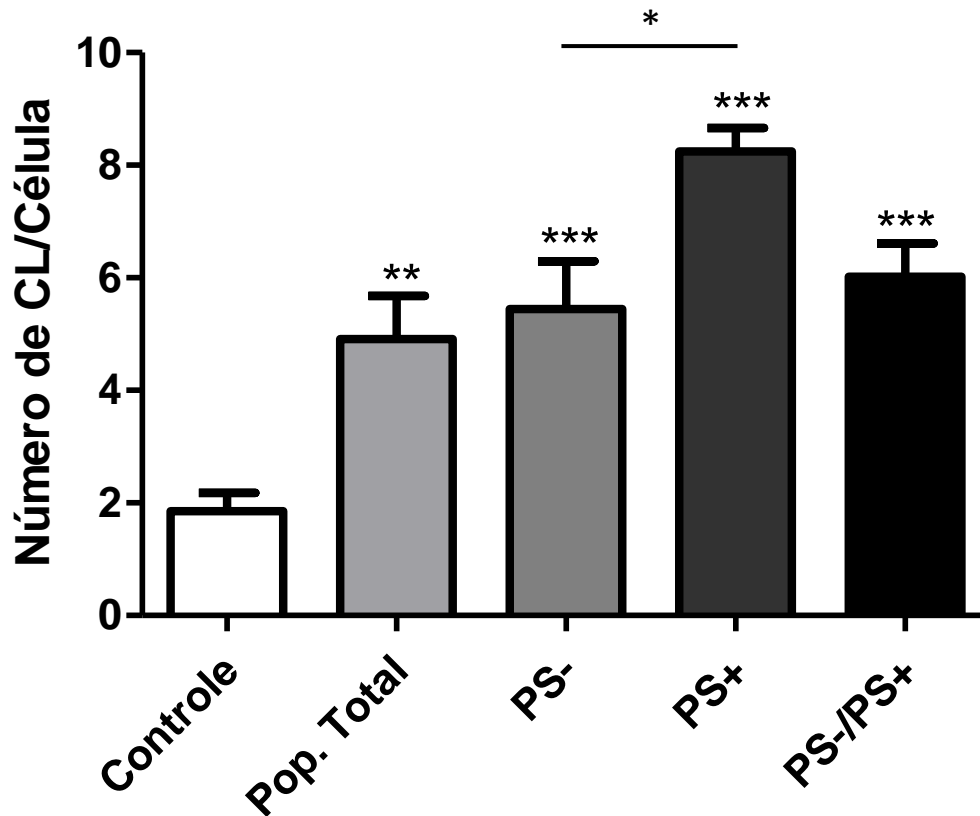


Figura 12 – O potencial indutor de CL não é perdido pela separação magnética. Macrófagos foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de SFB, e foram submetidos à infecção pelas subpopulações de *T. gondii*, população total, PS+ e PS-. Para observar se o processo de separação magnética estava alterando o poder indutor das subpopulações, reconstituímos a PS+ com a PS- na proporção de 50% de cada uma das subpopulações. Após 24 horas de infecção os macrófagos foram fixados e os CL corados com ORO. Por fim os CL foram quantificados. Diferenças significativas em relação ao controle, ** $P > 0,01$; *** $P > 0,001$. Gráfico representativo de três experimentos com desvio padrão.

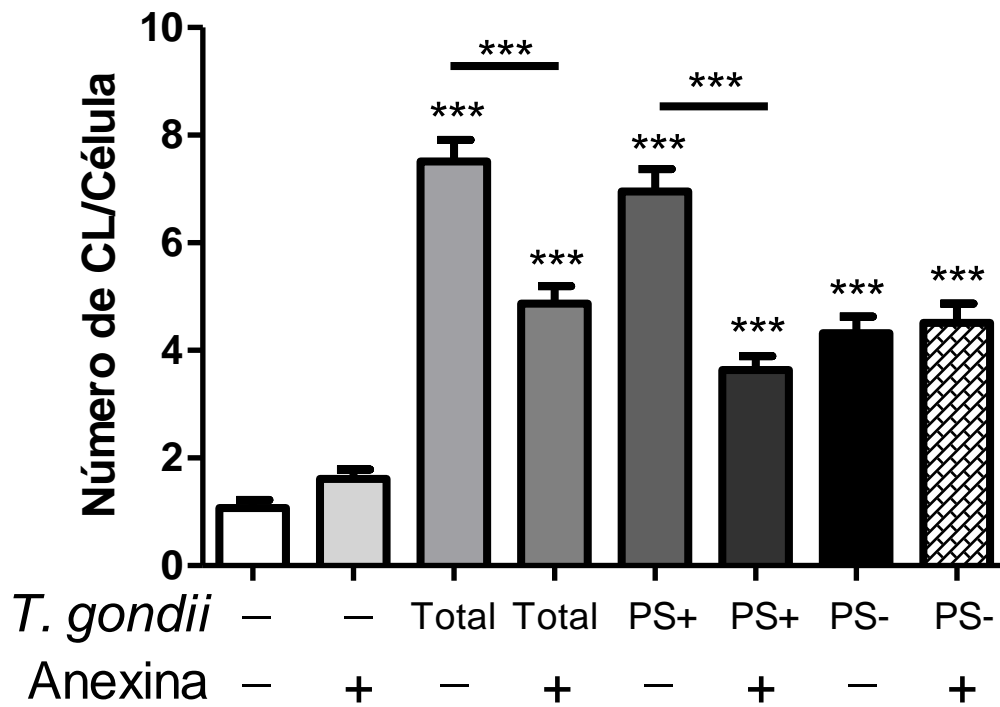


Figura 13 – Indução de CL frente a neutralização da fosfatidilserina por anexina V. Após a separação das subpopulações de *T. gondii*, os grupos foram divididos em tratados com anexina V purificada e não tratados. Esses grupos infectaram macrófagos com MOI de um por 24 horas. Passado o tempo, os macrófagos foram fixados, os CL da célula foram corados com ORO e por microscopia de campo claro, quantificados. O gráfico representa a média da quantificação de CL por célula, com barra de erro padrão, de três experimentos independentes. Diferenças significativas em relação ao controle, as barras horizontais acima das colunas representam a comparação das colunas e suas diferenças significativas.*** P>0,001. Média de três experimentos com erro padrão.

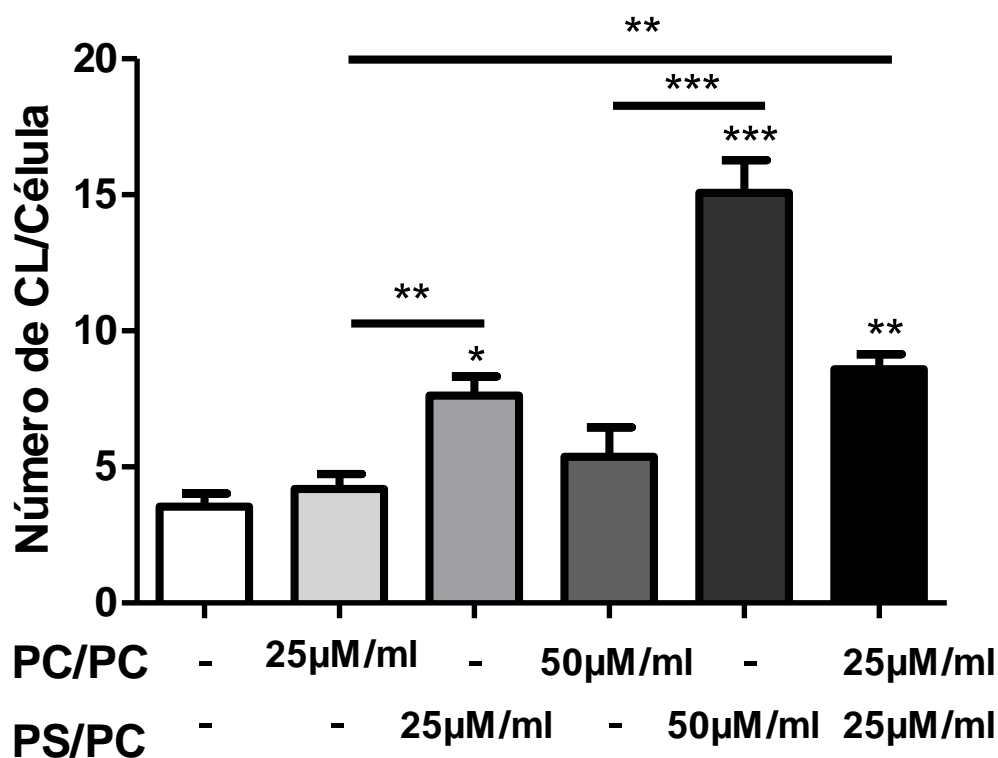


Figura 14 – Verificação de indução de CL por lipossomos purificados contendo fosfatidilcolina e/ou fosfatidilserina. Quantificação de corpúsculos lipídicos por macrófagos cultivados em RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino após interação com diferentes concentrações de lipossomos nas categorias: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) e mistura das duas categorias (PS/PC). Os macrófagos foram fixados, corados e os corpúsculos lipídicos quantificados 24h após interação. Diferenças significativas em relação ao controle, as barras horizontais acima das colunas representam a comparação das colunas e suas diferenças significativas. * - $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,001$. Média de três experimentos com erro padrão.

4.5 – Macrófagos infectados por *Toxoplasma gondii* apresentaram dois principais fenótipos com corpúsculos lipídicos: presença ou ausência do parasito.

Após interação com o parasito quatro grupos de macrófagos foram observados: a) macrófagos com *T. gondii* internalizado e CL, b) macrófagos sem *T. gondii*, entretanto com CL em seu citoplasma, c) macrófagos com *T. gondii* internalizado sem CL e d) macrófagos sem *T. gondii* internalizado e sem CL. Os dois primeiros grupos foram quantificados, pois foram majoritários e em torno de 42% das células apresentaram o perfil “a” e “b” (Figura 15). Interessante notar o relevante número de células que mesmo não tendo o parasito internalizado apresentaram CL (Figura 16).

Para observar se a presença do parasito era importante para maior indução de CL, macrófagos submetidos à interação tiveram seus CL quantificados levando em consideração a presença ou ausência de parasito dentro da célula avaliada. Confirmamos que macrófagos com *T. gondii* internalizado apresentaram maior número de CL quando comparado a macrófagos sem o parasito (Figura 17).

4.6 – Participação do TGF-beta na indução de corpúsculo lipídico após interação com *Toxoplasma gondii*

Os resultados até aqui descritos apontam para um aumento de CL independente da presença do parasito internalizado pelo macrófago, já que existem células que apresentaram maior quantidade significativa de CL e não possuem o parasito internalizado. Macrófagos infectados por *T. gondii* produzem TGF-beta e essa citocina pode atuar de forma parácrina e induzir CL. Para isso macrófagos foram infectados com o parasito na presença ou não de anticorpos neutralizantes de TGF-beta e o número de CL foram quantificados. Como observado na figura 18, a neutralização do TGF-beta resultou em menor número de CL em macrófagos.

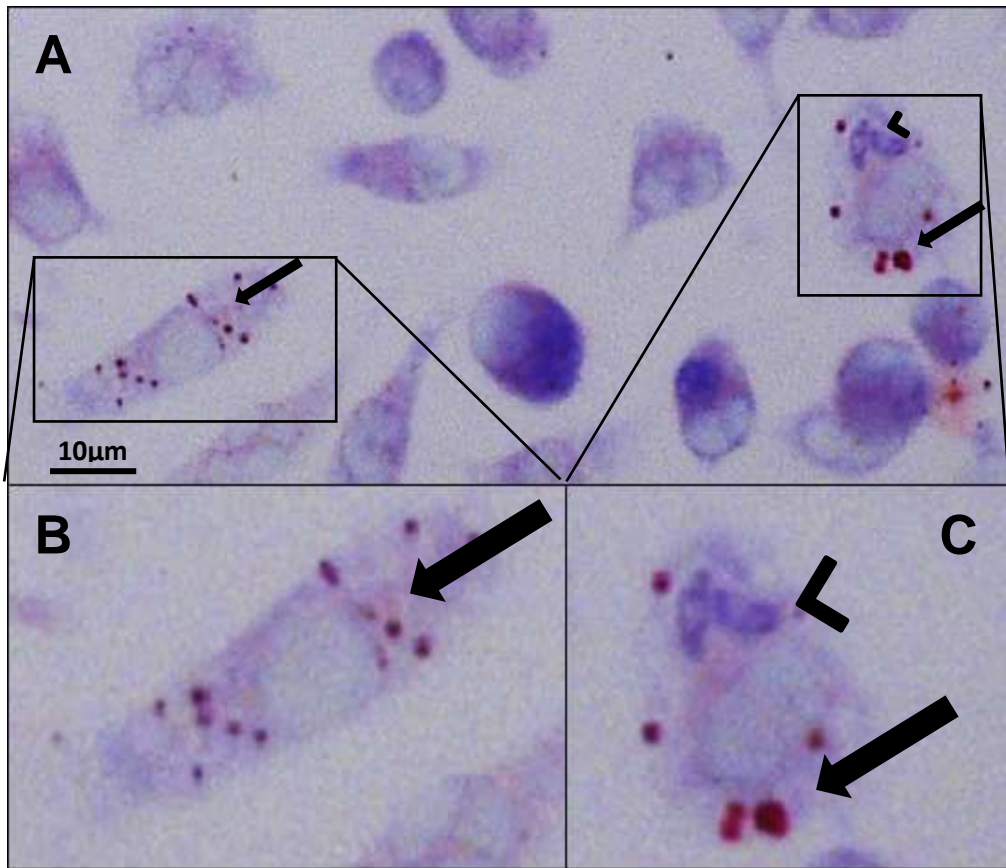


Figura 15 – Imagem representativa dos dois principais fenótipos encontrado em macrófagos após a infecção por *T. gondii*. Macrófagos de medula óssea foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino e foram infectados com *T. gondii* na proporção de 1:1 por 24 horas. As células foram fixadas e os CL foram corados com ORO e a célula com hematoxilina. Todas as células foram submetidas à infecção (A), porém somente algumas apresentam o *T. gondii*(cabeça de seta) internalizado, e o perfil de macrófagos com CL (seta) não está associado diretamente a presença do parasito. Em B, temos um macrófago com CL, porém, sem o parasito, já em C a imagem mostra o macrófago com CL e com *T. gondii* internalizado. A fotografia foi retirada em microscópio ótico de campo claro com aumento de 40x (A), as imagens B e C foram somente ampliadas.

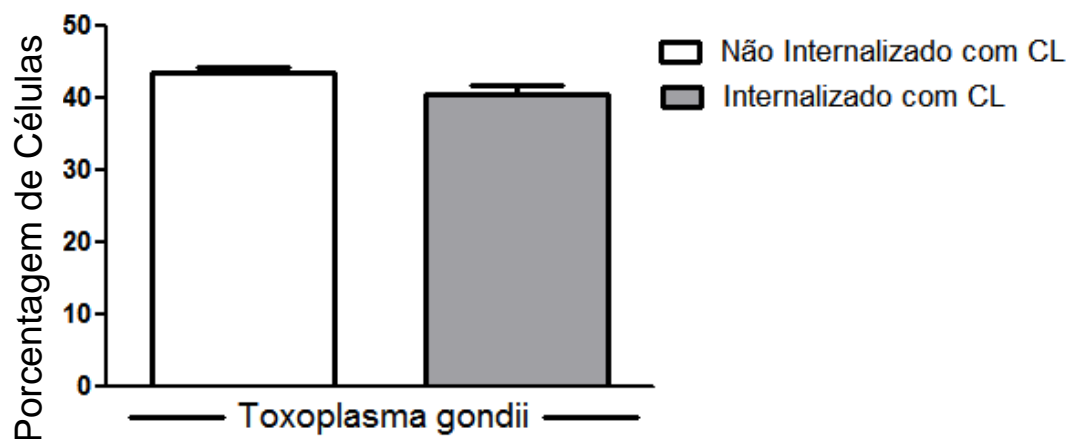


Figura 16 - Quantificação da frequência de células com CL na presença ou ausência de *Toxoplasma gondii*. Macrófagos foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de SFB e infectados com *T. gondii* por 24h seguindo a proporção de 1 parasito para 1 célula. As células foram fixadas, os CL corados com ORO e a célula com hematoxilina. O gráfico representa a quantificação, em porcentagem, de células, que possuem CL na presença ou ausência de *T. gondii* internalizado. Ambas as colunas representam macrófagos que interagiram com *T. gondii*. Média de cinco experimentos com erro padrão.

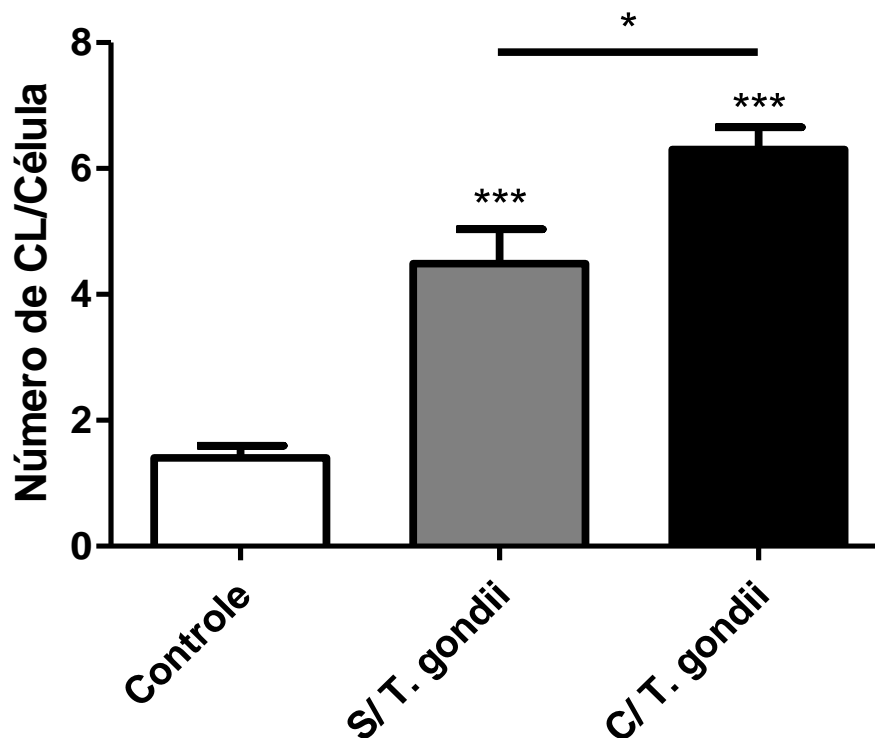


Figura 17 - Quantificação de corpúsculos lipídicos em células que apresentam o parasito internalizado ou não. Macrófagos foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de SFB e infectados com *T. gondii* por 24h seguindo a proporção de 1 parasito para 1 célula. Os macrófagos submetidos a infecção se apresentaram com CL e o parasito internalizado, ou com CL e sem parasito internalizado, então os CL de ambos os perfis foram quantificados e representados no gráfico. Os CL foram corados com ORO e a células com hematoxilina. Diferenças significativas em relação ao controle, as barras horizontais acima das colunas representam a comparação das colunas e suas diferenças significativas. *** $P > 0,001$, * $P > 0,05$. Média de cinco experimentos com erro padrão.

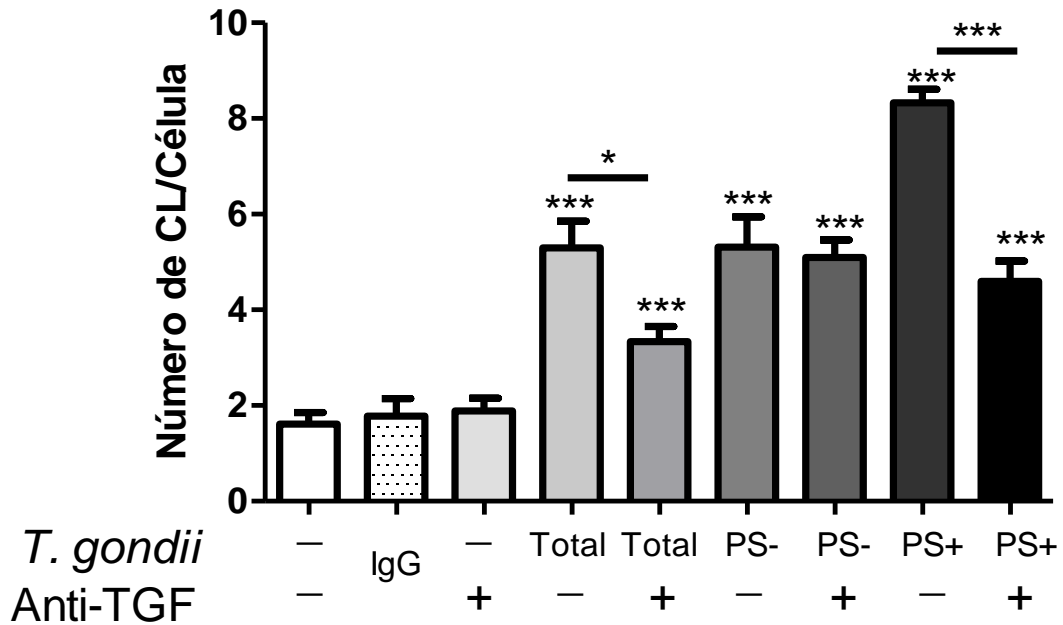


Figura 18 – Indução de CL em macrófagos infectados com diferentes subpopulações de *T. gondii* com ou sem neutralização de TGF-beta. Macrófagos foram cultivados em RPMI suplementado com 2% de nutridoma e infectados por 24 horas, na proporção de 1 parasito para 1 célula, com as subpopulações de *T. gondii*: População total, população fosfatidilserina positiva (PS+) e população fosfatidilserina negativa (PS-). Os macrófagos foram pré e pós infecção tratados com neutralizante de TGF-beta. As células foram fixadas, marcadas com ORO e hematoxilina, e os CL quantificados. Diferenças significativas em relação ao controle, as barras horizontais acima das colunas representam a comparação das colunas e suas diferenças significativas. *** P>0,001, * P>0,05, ***P>0,0001. Média de três experimentos com desvio padrão.

5 - Discussão

Toxoplasma gondii é um protozoário com alguns mecanismos de escape caracterizados. Um deles é baseado na exposição de PS por taquizoítos que reduz a produção NO, fundamental para a persistência do parasito em macrófagos ativados classicamente. Como células apoptóticas induzem CL em macrófagos, investigamos se a exposição de PS pelo *T. gondii* induz CL nessas células hospedeiras. Interessante observar que, macrófagos infectados com *T. gondii* apresentaram aumento de CL sugerindo que a exposição de PS pode ser responsável pela indução dessa organela. Essa indução coloca *T. gondii* na lista de parasitos “indutores de CL” como: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* (Melo *et al.*, 2006; 2005; 2003; Mattos *et al.*, 2010, Tanigawa *et al.*, 2008), *Trypanosoma cruzi* (D'Avila *et al.*, 2011; 2008a), *Plasmodium falciparum* (Jackson *et al.*, 2004), *Plasmodium berghei* (Rodriguez-Acosta *et al.*, 1998), *Leishmania amazonensis* (Pinheiro *et al.*, 2009), dengue vírus (Samsa *et al.*, 2009), vírus da hepatite C (McLauchlan, 2009; Barba *et al.*, 1998). A modulação positiva de CL nas células hospedeiras após a infecção indica que essa organela pode ser importante para o desenvolvimento do parasito. Porém, dependendo do parasito e da célula hospedeira, CL podem assumir importante função na montagem da resposta imune (D'Avila *et al.*, 2011; 2008a; Melo *et al.*, 2006; Melo e Dovorak, 2013). A importância do CL na infecção por *T. gondii* já havia sido demonstrado no trabalho de mestrado da aluna Laura Azeredo (Dissertação Mestrado. LBCT-UENF, 2009), foi observado que, soro de camundongo induziu CL em macrófagos, e que essa indução é importante para a multiplicação do parasito, uma vez que há uma associação entre essa organela e o parasito. Nossos resultados são complementares a esse já sugerido, uma vez que observamos a indução direta pelo parasito. Outro importante dado associado ao nosso é a presença de CL em células dendríticas de humanos infectados por *T. gondii* (Dissertação IOC, Biologia Celular e Molecular, Beatriz Guerreiro 2013). Todos esses resultados apresentam fortemente uma relação entre *T.gondii* e CL.

O potencial de indução de CL via infecção de *T. gondii* não foi depende da cepa utilizada, tanto ME-49 como RH são infectivas e foram capazes de induzir essa organela. As cepas de *T. gondii* são geneticamente classificadas em 3 grupos distintos apresentando características diferentes de virulência e produção de cistos em camundongo (Howe e Sibley, 1995; revisto em Weiss e Kim, 2000; Ajzenberg *et*

al., 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004). Ademais em humanos, as cepas do tipo I (como a RH) têm sido associadas com a toxoplasmose ocular na Europa e América do Norte (Boothroyd e Grigg, 2002; Kim e Weiss, 2004), e as do tipo II (como a ME-49) com infecção congênita e em pacientes com AIDS (Montoya e Liesenfeld, 2004). Portanto, mesmo com o uso de duas cepas geneticamente diferentes e com manifestação clínica em humanos distintas, CL foram induzidos em macrófagos de forma similar, sugerindo que a indução de CL é uma capacidade intrínseca de todas as cepas de *T. gondii*. Dados não publicados mostram que distintas cepas de *T. gondii*, incluindo RH e ME-49, expõem PS (Damasceno et al., submetido). Portanto, os dados desse trabalho corroboram com a hipótese do envolvimento da PS na indução de CL.

Os CL induzidos pela infecção de *T. gondii* se revelaram dependentes da relação parasito/célula. Quando maior a quantidade de parasito utilizado na interação, maior foi a indução de CL nos macrófagos. Nossos dados são semelhantes ao já publicados por D'Ávila e colaboradores (2008a, 2011), que mostraram que a indução de CL pela infecção por *T. cruzi* é dependente da proporção parasito-célula como para *T. gondii*. A determinação da relação parasito macrófago serviu para traçarmos o padrão mínimo de parasitos necessários para um estímulo que gerasse CL significativos, permitindo os experimentos subsequentes.

Quais fatores estariam envolvidos na geração de CL nos macrófagos infectados por *T. gondii*? Seabra e colegas (2004) mostraram a existência de uma subpopulação de *T. gondii* que expõem PS, esse fenômeno já havia sido descrito em *L. amazonensis* (Wanderley et al., 2006; de Freitas Balanco et al., 2001; Dos Reis e Barcinski, 2001) e mais tarde em *T. cruzi* (DaMatta et al., 2007). A hipótese de que o PS exposto por *T. gondii* poderia induzir CL foi aventada quando D'Ávila e colaboradores (2008) mostraram que neutrófilos apoptóticos provenientes da infecção de *Mycobacterium bovis* induzem CL em macrófagos, e que isso é importante para o sucesso da infecção. É sabido que células apoptóticas expõem PS na membrana, tal exposição permite o reconhecimento por fagócitos e induz nessas células um sinal anti-inflamatório (Vaux e Strasser, 1996; Fadok et al., 2001). Três importantes informações: 1) Células apoptóticas expõem PS na face externa da membrana; 2) *T. gondii* possui uma subpopulação que expõe PS; 3) Células apoptóticas induzem CL em macrófagos; auxiliaram na hipótese do presente trabalho. No intuito de verificar essa hipótese, subpopulações de *T. gondii* PS+ e PS-

foram separadas como descrito (Santos et al., 2011), utilizadas para interagir com macrófagos e CL analisados. O processo de separação das subpopulações rendeu boa pureza, indicando que a técnica é reproduzível. A subpopulação PS+ foi capaz de induzir maior número de CL em macrófagos, comparado com o controle e com a infecção pela subpopulação PS-. Esse resultado reforça a hipótese desse trabalho apontando a PS exposta na membrana do parasito como molécula importante no processo de biogênese de CL durante o curso da infecção. No entanto, a subpopulação PS- também foi capaz de induzir significativamente CL em relação ao controle, mas em menor número em relação a subpopulação PS+. Esse dado indica que outro(s) fator(es) participa(m) da biogênese dessa organela. Dados da literatura relatam que *T. cruzi*, secreta glicofosfatidilinositol (GPI) (Almeida et al., 1999; Campos et al., 2001), essa molécula é reconhecida por receptores da família TLR (Almeida et al., 1999; Campos et al., 2001). O referido reconhecimento induz a geração de CL em macrófagos (D'Ávila et al., 2008a; 2012). *Toxoplasma gondii* é capaz de sintetizar GPI (Manger et al., 1998 ;Black e Boothroyd, 2000; Lekutis et al., 2001; Wichroski e Ward, 2003), durante a infecção pelo *T. gondii* essa molécula é reconhecida por Toll 2 e Toll 4 e induz no macrófago a produção de TNF-alfa (Debierre-Grockiego et al., 2007;). Frente aos trabalhos levantados, sugerimos que a indução de CL em macrófagos pela subpopulação PS- poderia ser via Toll 2/Toll 4 através da GPI produzida pelo parasito.

O processo de separação das subpopulações poderia estar alterando o resultado de indução de CL em macrófagos? Para ratificarmos que o poder indutor de CL continuava mesmo após o processo de separação, adotamos a seguinte estratégia. Logo após a separação, as subpopulações foram misturadas; adotamos a proporção de 50% de cada subpopulação, pois essa é a porcentagem média descrita na literatura para taquizoítas da cepa RH (Seabra et al., 2004; Santos et al., 2011). Após análise da indução de CL, confirmamos que a metodologia de separação não foi capaz de alterar o poder indutor da população resultante, uma vez que não houve qualquer diferença significativa na indução de CL em macrófagos entre a população total e a população misturada.

A hipótese da participação da PS na indução de CL em macrófagos após a infecção por *T. gondii* foi reforçada quando utilizamos anexina V pura para bloquear a PS. Os parasitos foram separados em subpopulações PS+ e PS- ou mantidos na população total. Todos os grupos foram tratados com anexina V, e utilizados para

infectar macrófagos. O bloqueio da PS pela anexina reduziu o número de CL nos macrófagos, corroborando com os dados da importância da PS na indução dessa organela. Outro dado chamou a atenção, o bloqueio da PS diminuiu a geração de CL, no entanto, não a anulou. Isso reforça que outros fatores, além da PS, induzem CL nos macrófagos infectados por *T. gondii*. Sugerimos que em parasitos PS+ bloqueados pela anexina V CL estariam sendo induzidos por GPI secretada via reconhecimento pelos receptores TLR de macrófagos.

No intuito de confirmar a hipótese de que a PS induz CL, lipossomos formados com PS e PC ou somente com PC, foram usados na interação com macrófagos. Como esperado, houve indução de CL na interação que envolveu lipossomos PS/PC, enquanto que o número de CL de macrófagos não alterou quando lipossomos com PC foram utilizados. Na tentativa de mimetizar a população total de *T. gondii*, misturamos os lipossomos PC e lipossomos PS/PC na proporção de 50%, pois essa é a relação entre as subpopulações PS+ e PS- para *T. gondii* da cepa RH (Seabra et al., 2004; Santos et al., 2011). Essa mistura de lipossomos também foi capaz de induzir CL. O conjunto de nossos resultados aponta fortemente que a PS é um agente indutor de CL em macrófagos durante a interação, indicando que a hipótese desse trabalho é verdadeira.

Em todos os experimentos nos quais *T. gondii* foi utilizado, quatro fenótipos diferentes de macrófagos foram observados. Entre eles destacamos dois: Macrófagos com CL sem a presença de *T. gondii* interiorizado, e macrófagos com CL com a presença de *T. gondii* no citoplasma. Esse resultado é compartilhado aos resultados de células dendríticas infectadas por *T. gondii* (Dissertação Biologia Molecular e Celular – IOC – Beatriz Guerreiro). A quantificação dos fenótipos de macrófagos apresentou em média 40% de cada tipo. A quantificação de CL presentes em cada fenótipo de macrófago demonstrou que a presença do parasito dentro da célula foi crucial para maior indução de CL. Entretanto, os macrófagos sem o parasito também tiveram CL significativamente induzidos quando comparados ao controle. A literatura descreve a indução de CL via algumas classes de moléculas. Está demonstrado que o cultivo de leucócitos com ácidos graxos insaturados (Bozza et al., 1996; Bozza et al., 2009), lipoproteínas (McGookey e Anderson, 1983; Bozza et al., 2009), mediadores lipídicos como PAF (fator de ativação plaquetária) (Bozza et al., 1997), hormônios como leptina e resistina (Xu et al., 2006; Maya-Monteiro et al., 2008), citocinas como IL-5 e IL-12 (Bozza et al.,

1998), são indutores de CL. Além desses, TGF- β também induz CL nos macrófagos (D'Ávila et al., 2008a). O reconhecimento de PS por macrófagos induz a secreção de TGF- β ativo, essa citocina anti-inflamatória é importante para a supressão de resposta inflamatória mediada por macrófagos (Fadok et al., 2001). Como *T. gondii* expõe PS e induz a liberação de TGF- β em macrófagos infectados (Seabra et al., 2004), investigamos a participação desse mediador na indução de CL, pois uma sinalização parácrina explicaria a indução de CL em macrófagos sem parasito interiorizado. A utilização de anticorpo neutralizante de TGF- β foi capaz de inibir a indução de CL. Observamos que o neutralizante diminuiu CL na infecção pela população total de *T. gondii* e a subpopulação PS+ quando comparados com a interação na ausência do neutralizante. Concluímos que a indução de CL em macrófagos infectados seria via PS exposto pelo parasito que ativaria a liberação de TGF- β atuando nas células infectadas pela via parácrina e nas não infectadas pela parácrina.

Dados recentes de Lige e colaboradores (2013) demonstraram a existência de uma enzima (TgACAT) semelhante e com mesma função a de outra enzima já encontrado em células humanas, ACAT, essas enzimas desempenham a função de esterificar o colesterol e armazená-lo em vesículas lipídicas no interior do parasito, além de captá-lo da célula hospedeira e utilizá-lo para a formação de novas membranas. O não funcionamento de ACAT na célula hospedeira altera drasticamente a estruturação da membrana dos parasitos no vacúolo parasitoforo, além de diminuir o número de CL do parasito. Esses dados somados com os nossos contribuem para o entendimento da indução de CL nas células hospedeiras e a participação dessa vesícula lipídica para a manutenção do *T. gondii* e consequentemente sua multiplicação.

Não é difícil imaginar que o sucesso da toxoplasmose, sendo uma doença muito comum e não causando danos em seu hospedeiro na maioria dos casos, estaria atribuída também ao sucesso da infecção com mimetismo apoptótico, e controle da resposta imune e nesse processo o CL desempenharia um papel importante na disponibilidade de lipídeos. Durante anos o CL foi descrito como simples reserva lipídica, hoje vale lembrar que CL foram descritos desempenhando várias funções diferentes em resposta a diferentes estímulos, podendo ser organelas que auxiliam a função inflamatória quando anti-inflamatória (revisado Melo et al., 2012). A composição de CL e seus componentes influenciam nas diferentes frentes

de atuação por essas organelas (Bozza et al., 2009). Nosso caso pode ser aplicado nessa descrição também, demonstramos que a PS presente numa parte da população de *T. gondii* estimula CL, estímulo que é diferente ao presente na PS-. Ainda não há qualquer descrição sobre diferentes funções de CL numa mesma infecção, e mais experimentos ainda são necessários para concretizar essa hipótese, contudo, e diante dos nossos dados, sugerimos que isso pode estar acontecendo na infecção por *T. gondii*. Esse trabalho é apenas o início diante do universo de descobertas a serem feitas sobre a associação de CL com *T. gondii*.

6 - Referências Bibliográficas

Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 188:608–616.

Adams, L. B., Hibbs, J. B., Taintor, R. R. & Krahenbuhl, J. L. 1990. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-Arginine. *J. Immunol.* 144, 2725–2729.

Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. 2006 Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *Int. J. Parasitol.* 36:1373–1382.

Ajzenberg D, et al. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34:1185–1196.

Almeida IC, Camargo MM, Procópio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA. 2000. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J* 19(7), 1476–1485.

Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Bréchet C. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1200–1205.

Barragan A, Hitziger N. 2008. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. *Subcell. Biochem.* 47:198–207.

Barragan, A., and L. D. Sibley. 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* 195:1625–1633.), e patogênese em camundongos de laboratório

Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res*;48, 837–47

Bierly AL, Shufesky WJ, Sukhumavasi W, Morelli AE, Denkers EY. 2008. Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 181:8485–8491.

Black MW & Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:607–623.

Bliss SK, Gavrilescu LC, Alcaraz A, Denkers EY. 2001. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect. Immun.* 69:4898–4905.

Bosch TC, David CN 1984. Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol*, 104:161-171.

Botterel F, Ichai P, Feray C, Bouree P, Saliba F, Tur Raspa R, Samuel D, Romand S (2002). Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:1648–1650.

Bougnères L, Helft J, Tiwari S, Vargas P, Chang BH, Chan L, Campisi L, Lauvau G, Hugues S, Kumar P, Kamphorst AO, Dumenil AM, Nussenzweig M, MacMicking JD, Amigorena S, Guermontprez P (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity.* Aug 21;31(2):232-44.

Bozza P.T., J.L. Payne, S.G. Morham, R. Langenbach, O. Smithies, P.F. Weller (1996). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93,11091–96

Bozza P.T., R.C. Melo, C. Bandeira-Melo (2007). Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense, *Pharmacol. Ther.* 113, 30–49.

Bozza P.T., W. Yu, J. Cassara, P.F. Weller (1998). Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol.* 64,563-9.

Bozza PT & Viola JP (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prost. Leukot Essent Fatty Acids.* 2010 Apr-Jun;82(4-6):243-50

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* Jun; 1791(6):540-51.

Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF (1997). Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 186,909–20.

Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 38:2249–63.

Brasaemle DL. 2007. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48:2547–59.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1), 416–423.

Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML. 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40:4037– 4044.

Carruthers V & Boothroyd JC. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:83– 89.

Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. 1999 Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol.* 225-235.

Charron AJ & Sibley LD. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* Aug 1;115(Pt 15):3049-59.

Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. 2002. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 86,784–91.

Combe CL, et al. 2006. Lack of IL-15 results in the suboptimal priming of CD4₊ T cell response against an intracellular parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:6635– 6640.

Corrêa Soares JB, Maya-Monteiro CM, Bittencourt-Cunha PR, Atella GC, Lara FA, d'Avila JC, Menezes D, Vannier-Santos MA, Oliveira PL, Egan TJ, Oliveira MF (2007). Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *FEBS Lett.* 581, 1742-50.

DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhães L, Goldenberg S, de Souza W. 2007. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *Microbiol Lett.* 266, 29-33.

Dardé ML et al., 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32:27–38.

Darde ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39:551–558.

Darde ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78:786 –794.

Darde', M. L., Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. 1987. Differentiation isoenzymatique de 7 souches de *Toxoplasma gondii* par iso-electrofocalisation en gel de polyacrylamide. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 5:33–39.

Das M, Mukherjee SB, Shaha C. 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci*, 114:2461-2469.

D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2011. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 15;204(6):951-61

- D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. 2008. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *I. Immuno.* 8, 1308-15. Review.
- D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2006. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*, 176, 3087-97.
- D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. 2008b. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol* 10, 2589-604.
- D'Avila H, Toledo DA, Melo RC. 2012. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm.* 2012:478601.
- Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brézin A.. 2011. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 19:91–102.
- Delair E, Monnet D, Grabar S, Dupouy-Camet J, Yera H, Brézin AP. 2008. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 146:851– 855.
- Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B 2007. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin. Infect. Dis.* 45:e88–e95.
- Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L. 2004. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular Toxoplasma gondii infection. *Immunol. Rev.* 201:191–205.
- Derouin F & Pelloux H. 2008. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:1089 –1101.
- Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJ, Lariviere M. 1992. Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin. Infect. Dis.* 15:267–270
- Desmonts G, Couvreur J. 1974. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 290:1110 –1116.
- DosReis GA, Barcinski MA. 2001. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv Parasitol*, 49:133-161.
- Dubey JP. 1998. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. *Int. J. Parasitol.* 28:1019 –1024.
- Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 19:155–177.

Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.*, 23:537–546.

Dubey, J. P. 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.*, 82:957–960.

Dubey, J. P. 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.*, 87:215–219.

Dubey, J. P. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.*, 140:69–75.

Dubey, J.P., 2002. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.* 88, 713–717.

Dubey, J.P., 2005. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: In vivo stage conversion and strain variation. *Vet. Parasitol.* 133, 289–298.

Dubey, J.P., 2008. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. *J. Euk. Microbiol.* 55, 467–475.

Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide et al., 2001. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock *Int. J. Parasitol.* 31:1699 –1703.)

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R.. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353:1829 –1833.

Dvorak A.M., I. Hammel, E.S. Schulman, S.P. Peters, D.W. MacGlashan Jr., R.P. Schleimer, H.H. Newball, K. Pyne, H.F. Dvorak, L.M. Lichtenstein .1984. Differences in the behavior of cytoplasmic granules and lipid bodies during human lung mast cell degranulation, *J. Cell Biol.* 99, 1678–87.

Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan JrDW, Pyne K, et al. Lipid bodies. 1983. Cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 131, 2965–76.

Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, Morgan ES, Dvorak HF .1993. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int Arch Allergy Immunol* 101,136–42.

El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3(2):e14

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory

cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101:890-898.

Fadok VA, Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, 276:1071-1077.

Fentress SJ, Steinfeldt T, Howard JC, Sibley LD. 2012. The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol*, 14(12):1921-33

Ferguson DJ. 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol*. 18:355–359.

French AR, Holroyd EB, Yang L, Kim S, Yokoyama WM. IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation. *Cytokine* 35:229–234.

Frenkel, J. K. 1967. Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.*, 98:1309–1319.

Frenkel, J. K., & Ambroise-Thomas P. 1997. Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 83:1–5.

Frolich K, Madeo F. 2000. Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett*, 473:6-9.

Fujimoto T, Kogo H, Ishiguro K, Tauchi K, Nomura R. 2001. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell. *J Cell Biol*; 1079–85.

Fujisawa T, David CN. 1984. Loss of differentiating nematocytes induced by regeneration and wound healing in Hydra. *J Cell Sci*, 68:243-255.

Gazzinelli & Denkers E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Rev. Immunol.* 6, 895–906 (2006).

Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M. & Sher, A. 1991. Synergistic role of CD41 and CD81 T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.*, 146:286–292.

Gilbert R E, Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, Buffolano W, Stanford MR, Petersen E. 2008. Ocular sequelae of digenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2:e277.

Goldman, M., Carver, R. K. & Sulzer, A. J. 1958. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J. Parasitol.*, 44:161–171.

Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW .1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*;294(2):309–21.

Hofman P, Bernard E, Michiels JF, Thyss A, Le Fichoux Y, Loubière R. 1993. Extracerebral toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Pathol. Res. Pract.* 189:894 –901.

Howe DK & Sibley LD. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172:1561–1566.

Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJ, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. 2004. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*;54,109–22.

Jacobs, L., Remington, J. S. & Melton, M. L. 1960. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 46:23–28.

Jones JL, Dubey JP. 2010. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. *Exp. Parasitol.* 124:10 –25.

Jones JL, Sehgal M, Maguire JH. 2002. Toxoplasmosis-associated deaths among human immunodeficiency virus-infected persons in the United States, 1992-1998. *Clin. Infect. Dis.* 34:1161.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R Jr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 12:942– 949.

Khan, A., S. Taylor, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and L. D. Sibley. 2009. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulence in mice. *PLoS Genet.* 5:e1000404.

Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A. J., Boyle, J., Glover, R. D., Tang, K., Paulsen, I. T., Berriman, M., Boothrooyd, J. C., Pfefferkorn, E. R., Dubey, J. P., Ajioka, J. W., Roos, D. S., Wootton, J. C. & Sibley, L. D. 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res*, 33:2980–2992.

Kobatake E, Sugiyama T. 1986. Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra* XVII. Elimination of excess epithelial cells by phagocytosis in a mutant strain L4. *Dev Biol*, 115:249-255.

Laliberte J & Carruthers VB, 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:1900 –1915.

Lambert H, Barragan A. 2010. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 12:292–300.

Lehmann T, et al. 2004. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect. Genet. Evol.* 4:107–114.

Lekutis, C., D. J. Ferguson, M. E. Grigg, M. Camps, J. C. Boothroyd. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31: 1285-1292.

Liesenfeld O. 2002. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.* 185(Suppl 1):S96 –S101.

Lige B, Sampela V, Coppena I. 2013. Characterization of a sterol-esterifying enzyme in *Toxoplasma* highlights the importance of cholesterol storage pathways for the parasite. *Molecular Microbiology.* 87(5), 951-967

Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. 2005. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* 87,45–9.

Luft BJ, Remington JS. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15:211–222.

Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, Parton RG. 2005. Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem* 280,42325–35.

Martina MN, Cervera C, Esforzado N, Linares L, Torregrosa V, Sanclemente G, Hoyo I, Cofan F, Oppenheimer F, Miro JM, Campistol JM, Moreno A. 2011. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. *Transpl. Int.* 24:e6–e12.

Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, Pereira GM, Bozza PT, Pessolani MC. 2010. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* 87: 371–384.

Maya-Monteiro C.M., P.E. Almeida, H. D'Avila, A.S. Martins, A.P. Rezende, H. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza. 2008. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.* 283,2203–10.

McGhee RB, Cosgrove WB. 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* Mar;44(1):140-73.

McGookey DJ, Anderson RG. 1983. Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J Cell Biol.* Oct;97(4):1156-68.

McLauchlan J. 2009. Hepatitis C virus: viral proteins on the move. *Biochem Soc Trans* 37: 986–990.

Melo R.C.N., Fabrino, D.L., Dias F.F., Parreira, G.G. 2006. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm. Res.* 55, 342-8.

Melo RC, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue & Cell.* 35, 59–67.

Melo RC, Dvorak AM. 2012. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog.* 8(7):e1002729.

Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. 2005. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic.* 6, 1047-57.

Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, Salle B, Ajzenberg D, Dardé ML 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e876.

Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35:829–849.

Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39:23–39.

Monteiro VG, Lobato CS, Silva AR, Medina DV, de Oliveira MA, Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. 2005. Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol Res.* Nov;97(5):380-5.

Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965– 1976.

Mordue, D. G., F. Monroy, M. La Regina, C. A. Dinarello, and L. D. Sibley. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 167:4574–4584.

Moreira MEC, Del Portillo HA, Milder RV, Balanco JMF, Barcinski MA. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (L) amazonensis*. *J Cell Physiol*, 167:305-313.

Mosser DM. 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc.Biol.* 73:209 –212.

Mota, LAM. Macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com soro homólogo apresentam grande número de corpos lipídicos e ação microbicida reduzida contra *Toxoplasma gondii*. Tese de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do CBB, UENF, defendida em 13 de fevereiro de 2009.

Murphy DJ. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*;40, 325–438.

Murray, H. W., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., Harris, A. M. & Jaffee, E. A. 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent versus oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134, 1982–1988.

Nicolle, C., Manceaux, L., 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Seances Acad. Sci.* 147, 763–766.

Nicolle, C., Manceaux, L., 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Seances Acad. Sci.* 148, 369–372.

Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn M, Yang M, Pypaert M, Joiner KA, Coppens I. 2005. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol.* Jun;7(6):849-67.

Pacheco P., F.A. Bozza, R.N. Gomes, M. Bozza, P.F.Weller, H.C. Castro-Faria-Neto, Bozza P.T. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism, *J. Immunol* 169,6498–6506.

Pfefferkorn ER. 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:908 –912.

Pfefferkorn, L. C. & Pfefferkorn, E. R. 1980. *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. *Exp. Parasitol.*, 50:305– 316.

Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, Côrte-Real S, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. 2009. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect* 11: 181–190

Portugal LR, Fernandes LR, Alvarez-Leite JI. 2009. Host cholesterol and inflammation as common key regulators of toxoplasmosis and atherosclerosis development. *Expert Rev Anti Infect Ther.* ;7(7):807-19

R. Ross. 1995. Cell biology of atherosclerosis, *Annu. Rev. Physiol.* 57,791–804.

Radke, J. R., B. Striepen, M. N. Guerini, M. E. Jerome, D. S. Roos, and M. W. White. 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115:165–75.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. 2001. Toxoplasmosis p 205–346. *In* Remington JS, Klein J (ed), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia, PA.

Roberts F, Mets MB, Ferguson DJ, O'Grady R, O'Grady C, Thulliez P, Brézin AP, McLeod R. 2001. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. *Arch. Ophthalmol.* 119:51–58.

Rodríguez-Acosta A, Domínguez NG, Aguilar I, Girón ME. 1998. Characterization of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase-soluble antigen. *Med Biol Res.* 31, 1149-55

Roemer E, Blau IW, Basara N, Kiehl MG, Bischoff M, Günzelmann S, Kirsten D, Sanchez H, Wocker EL, Fauser AA. 2001. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. *Clin. Infect. Dis.* 32:E1–E8.

Rogers NM, Peh CA, Faull R, Pannell M, Cooper J, Russ GR. 2008. Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. *Transpl. Infect. Dis.* 10:71–74.

Ryter A. 1985. Relationship between ultrastructure and specific functions of macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 8(2):119-33.

Sabin, A. B. & Feldman, H. A. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108:660–663.

Sabin, A. B. & Olitsky, P. K. 1937. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science*, 85:336–338.

Sabin, A. B. 1942. Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. *Adv. Pediatr.*, 1:1–53.

Saeij JP, et al. 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314:1780 –1783.

Saeij JP, et al. 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445:324 –327.

Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* 5: e1000632. doi:10.1371/journal.ppat.1000632

Sanchez Mejia A, Debrunner M, Cox E, Caldwell R. 2011. Acquired toxoplasmosis after orthotopic heart transplantation in a sulfonamide allergic patient. *Pediatr. Cardiol.* 32:91–93.

Savill J, Fadok VA. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407:784-788.

Scharton-Kersten, T. M., Yap, G., Magram, J. & Sher, A. 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 185, 1261–1273.

Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA (2004) *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 324,744-52.

Sibley L.D & Boothroyd JC. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82– 85.

Sibley L.D. 2010. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:592–598.

Sibley, L. D., Leblanc, A. J., Pfefferkorn, E. R. & Boothroyd, J. C. 1992. Generation of a restriction-fragment-length-polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics*, 132:1003–1015.

Splendore, A., 1908. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. *Rev. Soc. Scient. Sao Paulo* 3, 109–112

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. & Remington, J. S. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240:516–518.

Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, Hayashi M, Takahashi S, Ikuyama S, Ito T, Ishii N. 2008. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 289: 72–79.

Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipidmonolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* 277, 44507–12.

Taylor, S., A. Barragan, C. Su, B. Fux, S. J. Fentress, K. Tang, W. L. Beatty, E. L. Haij, M. Jerome, M. S. Behnke, M. White, J. C. Wootton, and Sibley. L. D. 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. 15;314(5806):1776-80.

Tibayrene, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenie`re, S. F., Darde´, M. L. & Ayala, F. J. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5129–5133.

Vallochi AL, Muccioli C, Martins MC, Silveira C, Belfort R Jr, Rizzo LV. 2005. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 139:350 –351.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96:245-254.

Vaux DL, Strasser A (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Nati Acad Sci.* Mar 19;93(6): 2234-44.

Vieira-de-Abreu A., E.F. Assis, G.S. Gomes, H.C. Castro-Faria-Neto, P.F. Weller, C. Bandeira-Melo, P.T. Bozza. 2005. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33,254–61.

Vutova P, et al. 2007. Toxoplasma gondii inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cell. Microbiol.* 9:1556–1570.

Wanderley JL, Barcinski MA. Division of Experimental Medicine, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. 2010. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Feb 7.

Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. 2006. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.* 176, 1834-9.

Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA. 2009. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS One.* 29, 5733.

Xu. w, L. Yu, W. Zhou, M. Luo (2006), Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351,376–82.

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626–1629.

Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* 2000;95(3):1078–85.

Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Müller A, Hölscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103,13837-42.