

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
INFECTOLOGIA**

Paula Tatiana Mutão Ferreira

Avaliação do papel do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na ativação de macrófagos peritoneais e de medula infectados por *Toxoplasma gondii*

Uberaba-MG

2022

Paula Tatiana Mutão Ferreira

Avaliação do papel do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na ativação de macrófagos peritoneais e de medula infectados por *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração “Parasitologia e Imunologia Aplicadas”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira

Uberaba-MG

2022

Paula Tatiana Mutão Ferreira

Avaliação do papel do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na ativação de macrófagos peritoneais e de medula infectados por *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração “Parasitologia e Imunologia Aplicadas”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em _____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
Professora da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
(UFTM)

Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva
Professor da Disciplina de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
(UFTM)

Dra. Ana Carolina de Moraes Oliveira Scussel
Biomédica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
Professora da Disciplina de Histologia/Biologia Celular e Embriologia da Universidade Federal
de Uberlândia (UFU)

Prof. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro
Professora da Disciplina de Histologia/Biologia Celular e Embriologia da Universidade Federal
de Uberlândia (UFU)

"A felicidade exige valentia!"

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas, não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo!

Fernando Pessoa

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meninos que carregam a melhor parte de mim e todo o meu amor: meus filhos Bernardo e Augusto, que são meu sol e minha lua, minha alegria, minha inspiração, minha vida. Que vocês aprendam a fazer todas as coisas sempre com todo os seus corações meus filhos.

Agradecimentos

À Deus, por me capacitar com os dons necessários para exercer com amor o trabalho para o qual Ele me escolheu, por nunca me abandonar e por sonhar para mim os sonhos mais lindos.

À Nossa Senhora, em especial Medalha Milagrosa, que esteve e está sempre comigo nos momentos de dificuldade e também nos de alegria.

Aos meus filhos Bernardo e Augusto, que chegaram no meio dessa jornada e iluminaram como nunca antes a minha vida, por renovarem minhas esperanças, me tornarem uma pessoa melhor todos os dias, me completarem e me fazerem a mulher mais feliz que possa existir.

Ao meu esposo, Mário Sérgio, incentivador de toda essa trajetória acadêmica, meu melhor amigo, companheiro fiel e meu amor, pela disposição sem limites em fazer sempre o melhor para a nossa família.

À minha mãe, Leidinéia, por ter me proporcionado o necessário para seguir com os meus estudos, por uma vida inteira de dedicação e amor e por ser responsável por tudo de bom que existe em mim, mas especialmente por cuidar com tanto amor e dedicação da nossa família.

Ao meu pai, Eurípedes, por também ter me proporcionado o necessário para seguir com os meus estudos, mesmo sem talvez conhecer a real importância disso e por se orgulhar dos meus passos, o que significa muito para mim.

Ao meu irmão, Antônio, pelo apoio, incentivo e amor.

À família do meu esposo pelo companheirismo e apoio, principalmente nas dificuldades presentes durante o percurso das nossas vidas.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes nesse período, pelas palavras de carinho e incentivo.

À minha orientadora Dra. Angelica de Oliveira Gomes, pela oportunidade de realização de um trabalho o qual contribuiu para à Ciência e para a realização do sonho de ampliar meu conhecimento e obter a titulação de Doutora pela UFTM.

Ao meu coorientador e amigo, Dr. Carlo José Freire de Oliveira, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo entusiasmo com a realização de todos os trabalhos do Laboratório de Imunologia e principalmente pelos ensinamentos diários que certamente me fizeram crescer, e muito, profissionalmente.

À minha amiga, Ana Carolina de Moraes Oliveira Scussel, por toda trajetória que trilhamos durante a Pós-Graduação, e que nos fizeram tornarmos “madrinhas e afilhadas” de um momento maravilhoso das nossas vidas que foram nossos casamentos. Minha amiga-irmã, levarei nossa amizade por toda a vida. Obrigada por cada ensinamento técnico adquirido.

Aos integrantes do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia, professores, pesquisadores, secretárias, técnicos e colegas alunos, pelo auxílio sempre que necessário.

À equipe do laboratório de Imunologia do Dr. Virmondes Rodrigues Junior pela calorosa acolhida, pelas horas agradáveis de trabalho no laboratório, pelo auxílio técnico e científico, pelo conhecimento compartilhado e pela parceria que muito acrescentou a este trabalho e à minha formação.

Aos animais, por contribuírem com a ciência doando suas vidas.

Aos que manusearem esta dissertação, por prestigiarem nosso trabalho com sua leitura.

E a todos que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

RESUMO

Introdução: Macrófagos são células imunes com atividade fagocítica e que apresentam plasticidade, adquirindo fenótipos e funções dependendo do microambiente onde são encontradas (MOLAWI et al., 2013). As citocinas são pequenas moléculas secretadas por inúmeras células. O Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) é uma citocina inicialmente descrita devido a sua função de inibir a migração randômica de macrófagos. Atualmente, novas funções têm sido descritas para o MIF, como estimular funções inflamatórias em resposta a infecções por microrganismos, incluindo *Toxoplasma gondii*. No entanto, a função primordial do MIF relacionada aos macrófagos tem sido pouco abordada. **Objetivo:** Avaliar a possível participação de MIF nos processos de diferenciação de macrófagos peritoneais e de medula provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} machos fêmeas em resposta à infecção por *T. gondii*. **Materiais e Métodos:** Macrófagos peritoneais foram coletados de camundongos machos e fêmeas C57BL/6 WT e MIF^{-/-} após recrutamento com tioglicolato. Células da medula óssea foram coletadas para diferenciação em macrófagos. Macrófagos peritoneais foram tratados com 4-Iodo-6-fenilpirimidina (4-IPP) e infectados ou não por *T.gondii* durante 24h. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi coletado para análise de citocinas, uréia e óxido nítrico. Além disso, os macrófagos foram avaliados quanto à atividade fagocítica e taxas de invasão e proliferação de *T. gondii*. **Resultados:** O sexo de camundongos C57BL6 influencia no parasitismo de macrófagos peritoneais e de medula, sendo quem o parasito invade e prolifera mais em macrófagos derivados de camundongos fêmeas. A infecção por *T.gondii* desencadeou um aumento na produção de MIF no grupo WT, bem como um aumento na secreção de IL-10, TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17 nos macrófagos WT e MIF^{-/-}. Em relação à comparação entre os grupos, foi detectado que os macrófagos MIF^{-/-} secretaram mais IL-10 em relação ao WT, por outro lado, os macrófagos WT produziram maiores quantidades de TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17. A produção de uréia foi mais evidenciada em macrófagos MIF^{-/-} enquanto a produção de óxido nítrico foi maior em macrófagos WT. *T. gondii* apresentou maior capacidade de proliferação em macrófagos MIF^{-/-} e essas células também apresentaram atividade fagocítica aumentada. **Conclusão:** a infecção por *T. gondii* induz a ativação de macrófagos derivados de camundongos fêmeas estimulando a produção de citocinas. Na presença de MIF, macrófagos infectados por *T. gondii* produzem citocinas pró-inflamatórias compatíveis com o perfil de ativação de M1. A ausência de MIF causou redução significativa nas citocinas pró-inflamatórias que é equilibrada pelo aumento dos níveis de uréia e citocinas anti-inflamatórias. Esses macrófagos apresentaram capacidade fagocítica aumentada e ativação de características compartilhadas com o perfil M2.

Palavras-chave: MIF, D-DT, 4-IPP, macrófagos, *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

Introduction: Macrophages are immune cells with phagocytic activity that exhibit plasticity, acquiring phenotypes and functions depending on the microenvironment where they are found (MOLAWI et al., 2013). Cytokines are small molecules secreted by innumerable cells. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a cytokine initially described due to its function of inhibiting the random migration of macrophages. Currently, new functions have been described for MIF, such as stimulating inflammatory functions in response to infections by microorganisms, including *Toxoplasma gondii*. However, the primary function of MIF related to macrophages has been little addressed. **Objective:** Evaluate the possible participation of MIF in the differentiation processes of peritoneal and marrow macrophages from C57BL/6 WT and C57BL/6 MIF^{-/-} male and female animals in response to *T. gondii* infection. **Materials and Methods:** Peritoneal macrophages were found from male and female C57BL/6 WT and MIF^{-/-} mice after recruitment with thioglycolate. Bone marrow cells were collected for differentiation into macrophages. Peritoneal macrophages were treated with 4-Iodine-6-phenylpyrimidine (4-IPP) and infected or not with *T. gondii* for 24h. Then, the culture supernatant was collected for analysis of cytokines, urea and nitric oxide. Furthermore, macrophages were evaluated for phagocytic activity and rates of invasion and control of *T. gondii*. **Results:** The sex of C57BL6 mice influences the parasitism of peritoneal and marrow macrophages, as the parasite invades and proliferates more in macrophages derived from female mice. *T. gondii* infection triggered an increase in MIF production in the WT group, as well as an increase in the duo of IL-10, TNF, IFN- γ , IL-6 and IL-17 in WT and MIF^{-/-} macrophages. Regarding the comparison between groups, it was detected that MIF^{-/-} macrophages secreted more IL-10 compared to WT, on the other hand, WT macrophages produced greater amounts of TNF, IFN- γ , IL-6 and IL-17. Urea production was more evident in MIF^{-/-} macrophages while nitric oxide production was greater in WT macrophages. *T. gondii* showed greater spectrum capacity in MIF^{-/-} macrophages, these cells also showed increased phagocytic activity. **Conclusion:** *T. gondii* infection induces the activation of macrophages derived from female mice, stimulating the production of cytokines. In the presence of MIF, *T. gondii*-infected macrophages produce pro-inflammatory cytokines compatible with the M1 activation profile. The absence of MIF caused a significant reduction in pro-inflammatory cytokines that are balanced by increased levels of urea and anti-inflammatory cytokines. These macrophages had increased phagocytic capacity and activation of features shared with the M2 profile.

Key-words: MIF, D-DT, 4-IPP, macrophage, *Toxoplasma gondii*

LISTA DE ABREVIATURAS

T.gondii – *Toxoplasma gondii*

GM-CSF - (Fatores estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos)

TGF- β - Fator beta de transformação do crescimento

TLR - Receptores do Tipo Toll

ELISA – ensaio imunoenzimático

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PMN - Polimorfonucleares

DC - “*Dendritic cells*” (Células dendríticas)

M Φ - macrófagos

MHCII - “*Major histocompatibility complex*” (Complexo principal de histocompatibilidade)

β -Gal - β galactosidase

IC - “*Immune complex*” (Imunocomplexo)

IL - “*Interleukin*” (Interleucina)

i.p. - Intraperitoneal

LPS - “*Lipopolysaccharid*” (Lipopolissacarídeo) M1 - “*M1 Macrophages*” (Macrófagos M1)

M2 - “*M2 Macrophages*” (Macrófagos M2) NO - “*Nitric Oxide*” (Óxido nítrico)

NK – célula *natural killer*

IFN- γ - “*Interferon gama*” (Interferon gama)

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	16
Figura 2: Diferenciação, funções e fenótipo dos macrófagos.....	22
Figura 3: Invasão e proliferação de macrófagos peritoneais e de medula derivados de fêmeas e machos WT e MIF ^{-/-} ambos infectados pelo <i>T. gondii</i>	40
Figura 4: Avaliação da atividade fagocítica em macrófagos WT de origem peritoneal e macrófagos WT derivados da medula óssea infectados com <i>T. gondii</i>	42
Figura 5: Avaliação intensidade da atividade de <i>T.gondii</i> em macrófagos WT de origem peritoneal e macrófagos WT derivados da medula óssea infectados com <i>T. gondii</i>	43
Figura 6: ELISA e quantificação de citocinas por CBA para quantificar citocinas em sobrenadantes de macrófagos de C57BL/6 WT de medula e peritoneais.....	45
Figura 7: Quantificação de uréia e óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de macrófagos peritoneais e de medula. Macrófagos foram infectados ou não com taquizoítos de <i>T. Gondii</i>	47
Figura 8: Avaliação do recrutamento de macrófagos peritoneais em camundongos WT e MIF ^{-/-}	48
Figura 9: Viabilidade de macrófagos após tratamento com 4-IPP. Macrófagos C57BL/6 WT.	49
Figura 10: ELISA e quantificação de citocinas por CBA em sobrenadantes de macrófagos de C57BL/6 MIF ^{-/-} e WT.....	52
Figura 11: Quantificação de uréia e óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de macrófagos MIF ^{-/-} e WT.....	54
Figura 12: Frequência de mediadores secretados em macrófagos WT (radar preenchido de preto) e MIF ^{-/-} (radar preenchido de cinza) infectados por <i>T. gondii</i>	56
Figura 13: Proliferação de <i>Toxoplasma gondii</i> em macrófagos WT e MIF ^{-/-}	57
Figura 14: Ensaio de fagocitose de <i>T.gondii</i> e partículas de Zimosan em macrófagos WT e MIF ^{-/-}	59
Figura 15: Representação do papel de MIF na função e perfil de macrófagos em resposta à infecção por <i>T. Gondii</i>	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO.	62
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. ANEXOS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

O parasito *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez por Nicolle e Manceaux em 1908. O parasito foi identificado em tecidos dos órgãos do roedor, *Ctenodactylus gundi*, utilizado em uma pesquisa de leishmaniose no laboratório Charles Nicolle, no Instituto Pasteur na Tunísia. No Brasil, o parasito foi identificado nos tecidos dos órgãos de um coelho e foi descrito por Splendore (DUBEY, 2013).

T. gondii é um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e causador de doença potencialmente grave em animais e humanos. *T. gondii* é capaz de causar infecção em animais silvestres e domésticos e, estima-se que um terço da população humana mundial seja infectada por este parasita (PAPPAS et al., 2009). *T. gondii* apresenta uma diversidade de hospedeiros intermediários como as aves e mamíferos, incluindo o homem, e tem como hospedeiro definitivo os felídeos, dentre eles o gato doméstico (DUBEY, 1998).

A toxoplasmose é considerada uma infecção benigna em pacientes imunocompetentes, pois apenas cerca de 20% dos pacientes imunocompetentes apresentam sintomas da doença sendo que o principal deles é a linfadenopatia cervical e supraclavicular que consiste no aumento dos linfonodos, de forma indolor, mantendo-se aumentado por meses ou, mais raramente, anos. Outros sintomas comuns são febre, mal-estar e dores de cabeça (Gómez et al., 2007). Mesmo se tratando de uma doença em sua maioria assintomática em pacientes imunocompetentes, em imunodeprimidos (pacientes portadores de HIV ou transplantados) pode causar grandes complicações (Kaster e Buzoni, 1998). A sintomatologia exibida pelos grupos de risco para a toxoplasmose varia desde sintomas leves até problemas mais graves como retinocoroidite, encefalite, pneumonite, retardo motor, aborto espontâneo, morte neonatal, parto prematuro e perda da visão (Sibley et al., 1999; Lopes & Berto, 2012). Ademais, os sintomas estão associados com a forma clínica da doença. Cerca de 95% dos pacientes ocorre a reativação da doença, podendo ocorrer encefalite e pneumonite. Ainda, manifestações clínicas podem estar associadas, dependendo da disseminação e gravidade da doença, tais como febre, convulsões, confusão mental, hemorragias, tosse e falta de ar (Dedicoat & Livesley, 2006; Campina & Queiroz-Fernandes, 2018).

A infecção congênita também pode levar a consequências gravíssimas ao feto dependendo do trimestre da gestação, inclusive o aborto (HAMPTON, 2015). Uma apresentação sintomática comumente associada a toxoplasmose congênita, é a

toxoplasmose ocular, se manifestando nos primeiros dias ou anos de vida da criança. Esta representa 25% de crianças e adultos com uveíte e 35% com retinocoroidite (Valladares et al., 2020). Quando relacionada à toxoplasmose congênita, cerca de 85% dos casos de toxoplasmose ocular são bilaterais e devido ao risco de comprometimento da visão, o tratamento deve ser iniciado imediatamente (Gómez et al., 2007). No Brasil, esta forma clínica é bastante comum pois há estudos que exibem cerca de 95% de ocorrência de retinocoroidite em crianças com toxoplasmose congênita (Gómez-Marín, 2010).

1.2. Ciclo de vida e mecanismos de transmissão

T. gondii apresenta um ciclo heteroxeno, que desenvolve em duas fases distintas, no qual o gato ou outro felídeo é considerado hospedeiro definitivo e neste ocorre simultaneamente um ciclo sexuado, em células epiteliais do intestino, e um ciclo assexuado ocorrendo em outros tecidos. O homem e outros mamíferos, juntamente com as aves, são considerados os hospedeiros intermediários e possuem apenas o ciclo assexuado.

A infecção humana (**Figura 1**) pode acontecer por meio de consumo alimentar como: ingestão de alimentos crus ou mal cozidos com a carne contendo cistos ou ainda vegetais, frutas ou água contaminados por oocistos esporulados (BELLUCO et al., 2018). Outra via é a transmissão congênita em que os taquizoítos são transmitidos de uma mãe com infecção recente ou reativação da mesma para o feto em desenvolvimento através da placenta (BORGES et al., 2019). Outra fonte potencial de contaminação em humanos, embora rara, é a transfusão de sangue (FOROUTAN-RAD et al., 2016) ou órgão transplantado (DARD et al., 2018) de doadores infectados.

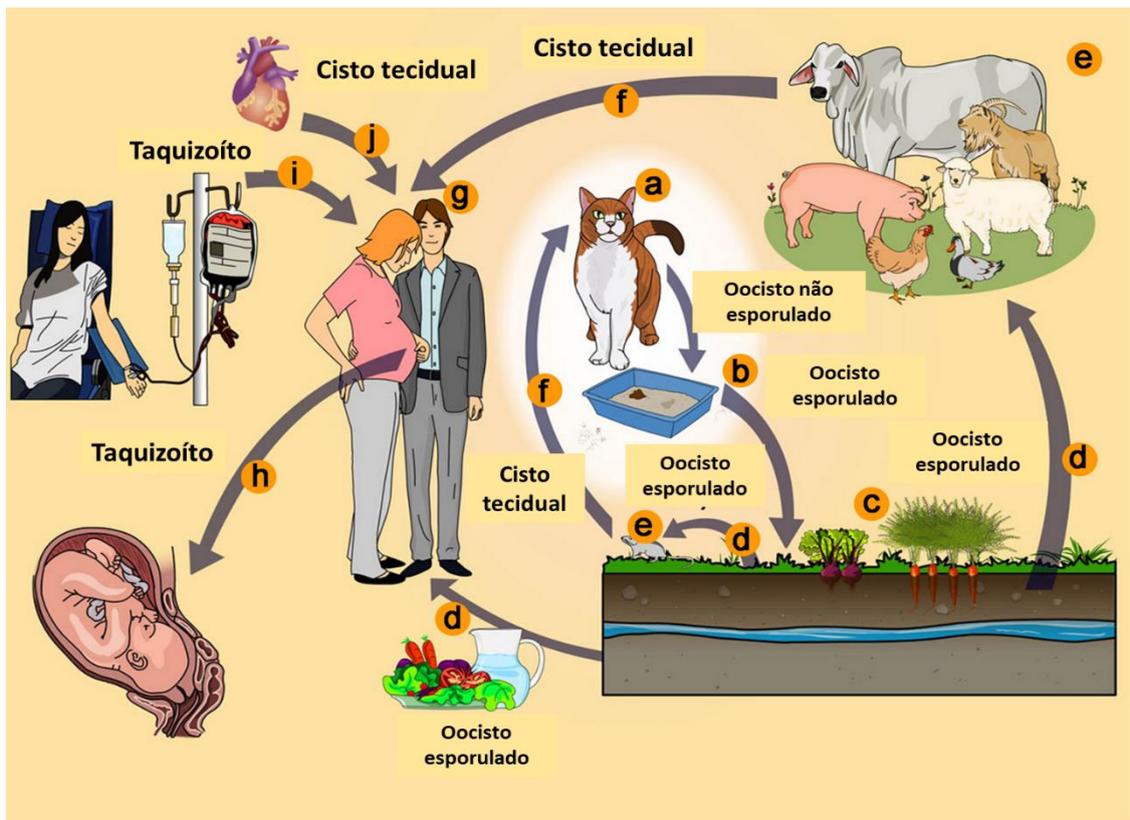


Figura 1: Vias de transmissão do *Toxoplasma gondii*. A) hospedeiro definitivo felino (gato). (B) Oocistos não esporulados em fezes de gato. (C) Alimentos contaminados com oocistos esporulados. (D) Os oocistos podem ser ingeridos por hospedeiros intermediários via água ou vegetais crus. (E) Hospedeiros intermediários (por exemplo, bovinos, ovinos, aves e suínos). (F) Ingestão de cistos teciduais em carne crua. (G) Hospedeiros intermediários (humanos). (H) Taquizoítos transmitidos através da placenta para o feto. (I) Transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos (J). Fonte: ATTIAS et al, 2020.

Após a ingestão de cistos por felídeos, como o gato, por exemplo, ocorre a destruição da parede do mesmo e os bradizoítos se estabelecem no interior de enterócitos onde sofrem multiplicações assexuadas. Posteriormente, durante o desenvolvimento sexual, há a formação de gametas masculinos e femininos. Após a fertilização os oocistos no interior dos enterócitos, são liberados e excretados como formas não esporuladas nas fezes dos gatos. Após a infecção, gatos não imunes podem eliminar oocistos durante 2 semanas, aproximadamente. O oocisto, em condições de umidade, temperatura e local sombreado favorável, é capaz de se manter infectante por cerca de 12 a 18 meses (ATTIAS et al, 2020).

Um hospedeiro suscetível (homem, por exemplo), adquire o parasito e desenvolve a fase assexuada após ingerir oocistos maduros (esporulados) contendo esporozoítos

encontrados em alimentos ou água contaminada, cistos contendo bradizoítos encontrados na carne crua ou, mais raramente, taquizoítos eliminados no leite. Os taquizoítos que chegam ao estômago são, na sua maior parte, destruídos pelo suco gástrico, mas os que penetrarem na mucosa oral poderão evoluir do mesmo modo que os bradizoítos e esporozoítos (ATTIAS et al, 2020).

Cada esporozoíto ou bradizoíto (após diferenciação para taquizoíto) sofrerá intensa multiplicação intracelular, após rápida passagem pelo epitélio intestinal, e invadirá vários tipos de células do organismo formando vacúolos parasitóforos. Os taquizoítos sofrerão divisões sucessivas por endodiogenia (fase proliferativa) que irão romper a célula parasitada (ou evadir destas células), liberando novos taquizoítos que invadirão novas células (ATTIAS et al, 2020).

1.3. Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose

Na população humana, as taxas de soropositividade para infecção por *T. gondii* podem variar de menos de 10% a mais de 90% dependendo do país ou região considerada e de parâmetros socioeconômicos regionais e hábitos da população. Há, por exemplo, uma maior prevalência na América do Sul, América Central e Europa continental, do que nos Estados Unidos da América ou o Reino Unido (SCHLÜTER et al., 2014).

Essa doença afeta cerca de um terço da população mundial cursando como uma infecção aguda ou crônica dependendo de aspectos como: mecanismo de infecção, competência imunológica do hospedeiro e cepa de *T. gondii* envolvida na infecção (DUBEY, 2010; RAMIREZ, 2013). A soroprevalência da infecção é variável: os números são elevados em países da América Latina e do Sudeste da África; sendo que no Brasil, essa taxa varia entre 50% a 80% (ZHANG et al., 2016).

Tal prevalência elevada e de distribuição cosmopolita pode ser explicada pelas características do parasito, tais como: pouca exigência metabólica e ambiental e grande capacidade de infecção (JENNES et al., 2017). Exemplo disso são os dados que apontam a toxoplasmose como a quarta causa de hospitalização e a segunda causa de morte, entre os 31 principais patógenos de origem alimentar, nos Estados Unidos (RANI e PRADHAN, 2021).

T. gondii é adquirido principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos do parasito além da transmissão congênita (NICOLLE E MANCEAUX, 1909). O parasito interage com macrófagos e tem um importante papel capaz de modular a resposta imune durante o curso da infecção (MUKHOPADHYAY, SAEIJ, 2020).

1.4. Imunidade na toxoplasmose

A partir do contato do taquizoítio com a célula hospedeira, inicia-se o processo de invasão celular. O parasito se reorienta de forma perpendicular à superfície celular através do seu polo apical e, no momento da adesão, por meio das roptrias e micronemas, o parasito secreta vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo, formando o chamado vacúolo parasitóforo (SOLDATI et al., 2001).

T. gondii é capaz de desencadear tanto uma resposta imune inata quanto adaptativa. Logo após a invasão celular, é desencadeada uma ativação não específica de macrófagos e células natural killer (NK), a qual limita a proliferação do parasito (DAVID SIBLEY L., 2011).

Estudos realizados com camundongos, demonstraram que a ativação de macrófagos ocorre pela produção de IFN- γ na presença de TNF- α , que origina a atividade citotóxica dos macrófagos contra *T. gondii* (DUPONT et al., 2012).

Mecanismos oxidativos e não oxidativos, como a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados por IFN- γ são capazes de inibir a replicação de *T. gondii* e gerar sua destruição (DAVID SIBLEY L., 2011).

As células produtoras de IL-12 como células dendríticas e macrófagos são importantes para o controle do parasito no curso inicial da infecção, mas vários outros tipos de células, incluindo neutrófilos e monócitos inflamatórios, também são envolvidos. Isso também depende do tropismo do parasito e do sítio de infecção. Quando hospedeiros intermediários são infectados através da ingestão de alimentos contaminados, as primeiras células infectadas são células epiteliais intestinais e células peritoneais. Células linfóides inatas (ILCs) produzem altos níveis de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e ajuda na proteção contra infecção por *T. gondii* no intestino e órgãos linfóides secundários (BECK et al., 2010 e IVANOVA et al., 2019).

1.5. Macrófagos

Macrófagos são células imunes com atividade fagocítica, exercendo um papel essencial no controle da homeostase e regulação da resposta múltipla contra patógenos (WYNN et al., 2013). Essas células apresentam plasticidade, adquirindo fenótipos e funções dependendo do microambiente onde são encontradas (MOLAWI et al., 2013).

Os macrófagos apresentam uma forma variável, geralmente oval, com contornos irregulares, núcleo numa posição descentrada e citoplasma abundante com grau de vacuolização variável, dependente da formação de vesículas de pinocitose ou fagocitose.

Podem apresentar pseudópodes que resultam de filamentos de actina, conferindo-lhes um movimento ameboide e permitindo-lhes direcionar o seu movimento (ZELLFORSCH et al., 2012).

Devido às suas características importantes como a heterogeneidade e a plasticidade, agentes patogênicos, tecidos lesados, ou células ativadas da imunidade adaptativa geram sinais em diversos microambientes que desencadeiam a ativação de programações genéticas distintas nos mesmos induzindo diferentes estados de polarização funcional (MANTOVANI et al., 2005).

Estas células são metabolicamente ativas, influenciando as funções locais e sistêmicas pela secreção de uma grande diversidade de moléculas onde se incluem as citocinas, quimiocinas e factores de crescimento (TAYLOR et al., 2005).

A cavidade peritoneal abriga uma variedade de células do sistema imune (linfócitos T e B), células NK, granulócitos e fagócitos do sistema mononuclear, além de grande parte dos órgãos. Os fagócitos vêm sendo extensivamente utilizados como ferramenta experimental desde o início dos estudos da biologia dos fagócitos devido à facilidade de isolamento dos mesmos do compartimento peritoneal (COHN, 1962A., COHN, 1962B., COHN, 1962C).

Os macrófagos diferenciados de monócitos sanguíneos derivados da medula óssea de camundongos expressam níveis mais baixos de F4/80 e altos níveis de CD11b enquanto os macrófagos residentes de origem embrionária são caracterizados por níveis elevados de expressão do marcador de macrófago F4/80. Observou-se também que os macrófagos residentes em tecidos derivados do saco vitelino e derivados de adultos coexistem em muitos órgãos diferentes (STEFATER et al., 2011; DAVIES et al., 2013; DIVANGAHI et al., 2015).

1.6. Polarização de macrófagos

Os macrófagos podem ser estimulados a aumentar as suas funções efetoras (SOLINAS et al., 2009). Essa ativação é necessária para que os monócitos circulantes terminem a sua diferenciação em macrófagos, quando recrutados pelos tecidos, sendo os monócitos muito suscetíveis de sofrerem alterações quando sujeitas a algum estímulo (BENOIT et al., 2008). O estado de ativação é altamente flexível e depende da localização do tecido e do microambiente (PIXLEY E STANLEY, 2004; SOLINAS et al., 2009).

Os macrófagos são classificados em M1 e M2 baseados no tipo de estímulo, expressão da molécula de superfície, função e perfil de secreção (Figura 3). Os macrófagos M1 têm atividade antipatógeno. Os macrófagos M1a são estimulados por IFN γ , enquanto os macrófagos M1b são estimulados por LPS (MUKHOPADHYAY et

al., 2004; MARTINEZ et al., 2008).

Macrófagos M1 são conhecidos por ter habilidade em secretar citocinas pró-inflamatórias, gerar altos níveis de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Portanto, eles têm uma potencial capacidade microbicida de patógenos (MURRAY et al., 2014). A principal via efetora de macrófagos é mediada por produção de óxido nítrico (NO) através da enzima “inducible NO synthase” (iNOS), usando L-arginina como substrato. A via metabólica alternativa utiliza arginase para converter L-arginina em Lornitina, tendo como produto final uréia (MUNDER et al., 1999). A iNOS é pertencente à uma família de enzimas conhecidas como NOS. Três isoformas distintas de NOS foram descritas como produto de três diferentes genes, apresentando diferenças na localização intracelular, regulação e propriedades catalíticas. NOS1 (também denominada nNOS) é prevalente em neurônios; NOS2 (conhecida com iNOS) está presente em várias células do sistema imune; e NOS3 (também chamada eNOS) é encontrada em células endoteliais (BRONTE e ZANOVELO, 2005).

Citocinas com perfil inflamatório como IL-12, IFN- γ e TNF direcionam macrófagos para ativação clássica, conhecida como perfil M1. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-13 e IL-10 direcionam macrófagos para um perfil de ativação alternativa, conhecida como M2. Macrófagos M2 são caracterizados por atividade arginase, expressão de receptores de manose e secreção e citocinas anti-inflamatórias. Eles têm uma importante capacidade de reparo tecidual e são menos efetivos na destruição intracelular de patógenos (MURRAY et al., 2014).

As populações de macrófagos M1 e M2 devem ser equilibradas para um correto funcionamento do organismo e proteção do hospedeiro, originando em caso de desequilíbrio situações patológicas. Se o desequilíbrio pender para um número de células M1 superior, leva a indução de doença inflamatória crônica; no entanto, se o desequilíbrio se der no sentido contrário proporciona imunossupressão (MOSSER E EDWARDS, 2008; POLLARD, 2009).

As células estimuladas concomitantemente com IFN- γ e produtos microbianos, como LPS, ativas classicamente (macrófagos M1) destroem microrganismos por liberação de NO, além de induzir a expressão de CXCL10, CXCL9 e IL-12 (HU.X et al., 2012; SICA et al., 2014). L. Kong et al., 2015 demonstrou que uma alta concentração de NO em macrófagos peritoneais de ratos está intimamente associada à sua resistência inata à infecção por *T. gondii*. Já as células estimuladas com citocinas IL-4 e IL-13, produzidas em um microambiente padrão Th2 (macrófagos M2) (GORDON, 2003), raramente expressam iNOS, porém apresentam altos níveis de arginase 1 (Arg-1) por desviar a via metabólica do NO para a produção de prolina. Por essa razão, essas células

não conseguem produzir NO e, portanto, não tem capacidade microbicida para patógenos intracelulares (HESSE et al., 2001; MODOLELL et al., 1995).

A fagocitose é um processo altamente conservador e crítico para a defesa do hospedeiro e remodelamento tecidual. Os macrófagos são células fagocíticas especializadas. Macrófagos M2 e macrófagos teciduais residentes são tipicamente semelhantes ao “M2-like”, eliminando detritos celulares e células mortas por fagocitose. Portanto, os macrófagos M2 geralmente exibem alta atividade fagocitária. Macrófagos M2 são anti-inflamatórios e promovem o reparo tecidual (**Figura 2**). Macrófagos M2a com um fenótipo predominantemente antiinflamatório são polarizados por IL-4 e IL-13 e secretam antagonistas dos receptores de IL-10 e IL-1 para suprimir respostas inflamatórias (LEE et al., 2001; SIERRA-FILARDI et al., 2010; JETTEN et al., 2014). Os macrófagos M2b com fenótipos pró e anti-inflamatórios produzem IL-1 β , IL-6, TNF α e IL-10 estimulados via LPS (MOSSER, 2003). Macrófagos M2c são ativados por IL-10 e secretam: fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1) e glicocorticóides (MOSSER E EDWARDS, 2008). Os macrófagos M2d são ativados pelo receptor agonista de adenosina A2A (A2AR) e receptor agonista de Toll-like (TLR) (FERRANTE et al., 2013). Os macrófagos M2f são estimulados por depuração apoptótica de macrófagos (MAC) (O'ROURKE et al., 2019).

As células apoptóticas podem regular o fenótipo polarizador dos macrófagos e, assim, aumentar a função anti-inflamatória dos macrófagos M2 através da fagocitose. Por exemplo, a endocitose de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo apoptótico (AD-MSCs) reduz a produção de TNF α e NO e aumenta os níveis de IL-10 para promover a polarização do macrófago M2 (GHAHREMANI PIRAGHAJ et al., 2018). Os macrófagos digerem o fagossomo com a produção de um grande número de nutrientes, como aminoácidos e colesterol (KIMURA et al., 2016).

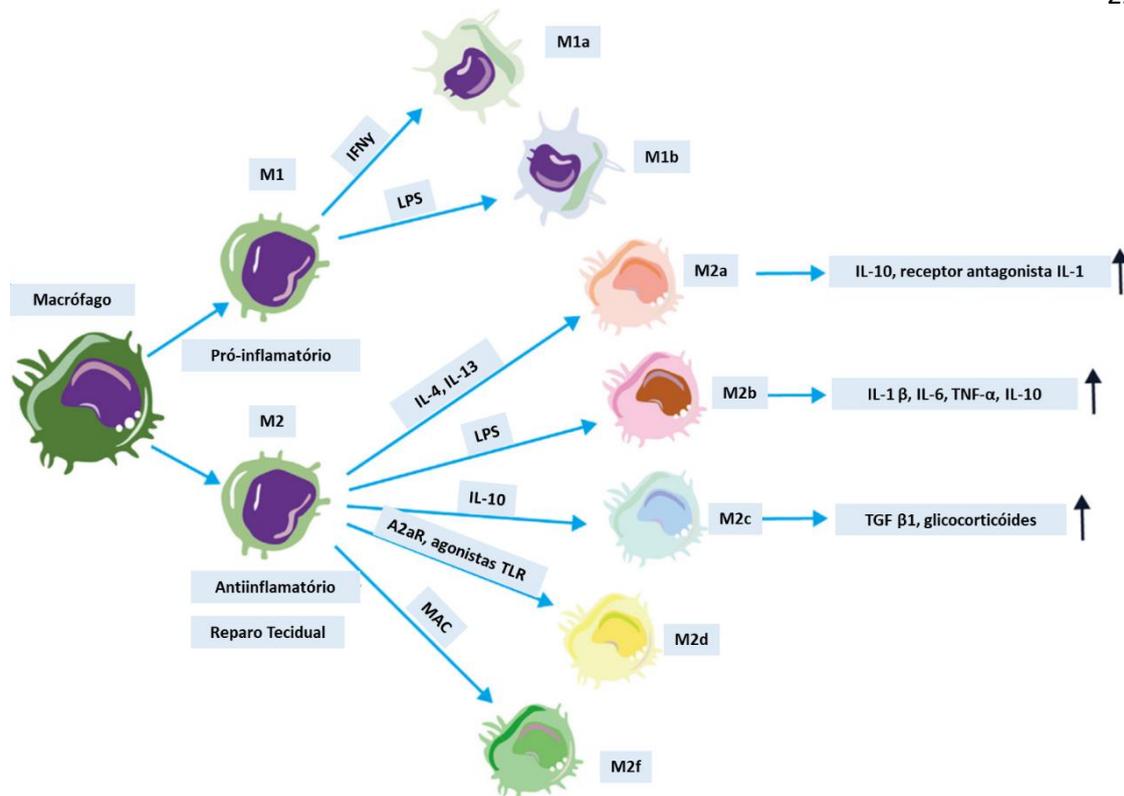


Figura 2: Diferenciação, funções e fenótipo dos macrófagos. Os macrófagos são classificados em M1 e M2 com base no tipo de estímulo e função. Os macrófagos M1 têm atividade pró-inflamatória e os macrófagos M2 têm atividade anti-inflamatória e de reparo tecidual. Esses macrófagos são divididos em subtipos com base nos seus estímulos. Os macrófagos pró-inflamatórios M1 são divididos em macrófagos M1a estimulados por $\text{IFN}\gamma$ e macrófagos M1b estimulados por LPS. Macrófagos anti-inflamatórios M2 são divididos em macrófagos M2a estimulados por IL-4 e IL-13, macrófagos M2b estimulados por LPS, macrófagos M2c estimulados por IL-10, macrófagos M2d estimulados por agonistas dos receptores A2AR e TLR e macrófagos M2f estimulados por depuração apoptótica de macrófagos. Os macrófagos M2a podem suprimir as respostas inflamatórias. Os macrófagos M2b têm atividade pró e anti-inflamatória. Os macrófagos M2c podem secretar $\text{TGF}\beta 1$ e glicocorticóides. Fonte: CHEN, 2022 (Modificado pelo autor, 2022).

1.7. Fator de inibição da migração de macrófagos (MIF)

Citocinas são pequenas proteínas liberadas por células, tendo um papel importante na interação celular. São produzidas por uma numerosa população de células tais como células T e macrófagos. Citocinas agem como importantes reguladores e tem um papel crucial na resposta imunológica, sendo capaz de modular alguns mecanismos patofisiológicos que levarão ao desenvolvimento de doenças (ZHANG e MOSSER, 2008). A citocina conhecida como MIF (Fator de Inibição da Migração de Macrófagos) foi descrita em 1966 por David e Bloom e Bennet, correlacionada com as funções gerais de ativação de macrófagos (CHURCHILL et al, 1975; NATHAN et al, 1971) como a inibição da migração randômica de macrófagos (CHUANG et al, 2004).

MIF é secretada por uma grande variedade de células relacionadas às respostas

imunológicas tais como linfócitos T, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos (BAUGH et al, 2002). Além disso, células do sistema fisiológico também são capazes de secretar esta citocina, tais como: células parietais do estômago, células epiteliais da pele, trato gastrointestinal e geniturinário, células β -pancreáticas, glândula pituitária (CALANDRA; ROGER, 2003; MAASER et al., 2002; WAEBER et al., 1997), fibroblastos (HONDA et al, 2008), trofoblasto (FARIA et al, 2010) e células endoteliais (NISHIHIRA et al, 1998).

MIF encontra-se pré-formada e armazenada intracelularmente, precisando apenas de um estímulo para ser liberada, o que a torna um relevante fator em respostas inflamatórias agudas (CALANDRA; ROGER, 2003). Foi demonstrado também que a secreção de MIF é mediada pela proteína p115 associada ao Golgi (MERK, et al., 2009). Estresse, infecções e estímulos imunológicos, como as citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF e MIF age através da sua ligação com o receptor CD74 de alta afinidade. Após interação com o receptor, ocorre a transdução de sinais com subsequente fosforilação de ERK1/2 que culmina na transcrição de genes, expressão de moléculas efetoras e proliferação celular (MITCHELL, et al., 1999, LUE, et al., 2011). A fosforilação de ERK1/2, dependente de proteína quinase A, ativa a fosfolipase A2 e induz a síntese de prostaglandina E2 (PGE2). O efeito imunossupressor de glicocorticóides é sobreposto pela ativação da via ERK1/2 (MITCHELL et al., 1999). No entanto, já foi visto o papel imunossupressor de PGE2 quando induzida a produção de citocinas do perfil TH2, como um mecanismo de fuga utilizado por alguns patógenos favorecendo a persistência da infecção (BARBOSA et al., 2014). MIF participa do processo de ativação do fator de transcrição NF- κ B, devido sua atuação na super expressão de TLR4 e, consequentemente, indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (ROGER et al., 2001).

Particularmente em macrófagos e células tumorais, MIF regula funções-chave como crescimento, migração, supressão de apoptose, sobrevivência e inativação de inibidores do ciclo celular (GORE et al., 2008; HUDSON et al., 1999; LUE et al., 2007; MITCHELL et al., 2002; SONG; OUYANG; BAO, 2005). Além disso, MIF tem ação antiapoptótica em macrófagos, função esta que modula a resposta inflamatória. Os macrófagos são os principais armazenadores e possuem altas concentrações de MIF, o que previne o acúmulo de p53 em seus citoplasmas levando à sobrevida aumentada dos mesmos e a uma resposta inflamatória contínua. (MITCHELL et al, 2002).

Outro meio que também pode resultar na inibição da apoptose celular é a ativação da MAPK (proteína-quinases ativadas por mitógenos) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) pela ligação ao receptor CD74. (MITCHELL et al, 2002; CALANDRA &

ROGER, 2003; GABER et al, 2011). Apesar de ainda existirem ações de MIF a serem compreendidas, é evidente o papel exercido por essa proteína na regulação do sistema imune inato e adaptativo. Quando ocorre a liberação de MIF, este atua como uma citocina pró-inflamatória clássica que ativam macrófagos e células T promovendo tanto a resposta imune inata quanto a adquirida. Dentre as citocinas produzidas em resposta a MIF, estão TNF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, além de mediadores inflamatórios tais como NO (óxido nítrico), COX2, metaloproteinases e seus inibidores (CALANDRA et al, 1994; MITCHELL et al, 1999; BOZZA et al, 1999).

Novas funções biológicas têm sido descritas para MIF desde sua descoberta (CHUANG et al., 2004). Como uma citocina pró-inflamatória, MIF promove a morte de parasitos intracelulares, devido à habilidade em inibir a migração randômica de macrófagos, sugerindo que essas células acumulam no lugar de ação (BERNHAGEN et al., 1998). Em diversas doenças tais como o choque séptico, artrite reumatoide, doenças inflamatórias de pulmão e câncer, (CALANDRA et al., 1995; LUE et al., 2002, 2006, 2007; VIGANO et al., 2007), parasitoses (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2011; FERRO et al., 2008; FRANCO et al., 2011), MIF é considerado um mediador crítico. Em concentrações adequadas, MIF apresenta uma potente resposta inflamatória capaz de promover a eliminação de parasitos, como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii* (CHAISAVANEYAKORN et al., 2002, REYES et al., 2006; JÜTTNER et al., 1998; FLORES et al., 2008, GOMES et al., 2018, MARCON et al, 2020).

1.8. D-dopacromo tautomerase (DDT)

A cascata de sinalização de MIF começa com a ligação de MIF ao domínio extracelular da proteína de membrana integrada não polimórfica tipo II CD74 (Trivedi-Parmar e Jorgensen., 2018). A sinalização induzida por MIF atua através de algumas vias a jusante, incluindo as vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K). A D-dopacromo tautomerase (DDT) participa da cascata MIF atuando como um segundo ligante para CD74, que exibe uma forte semelhança estrutural e uma distância genética próxima com MIF (Merck, et al., 2011). Funcionalmente, DDT e MIF se sobrepõem significativamente em termos de controle de sobrevivência celular, formação de tumor e migração tumoral, enquanto DDT e MIF regulam aditivamente o crescimento e a sobrevivência de células cancerígenas (Merck, et al., 2011). A dupla inibição de DDT e MIF também reflete um efeito sinérgico, uma vez que o DDT pode compensar a inibição única de MIF (PASUPULETI, et al., 2014)..

Embora camundongos knockout para receptores MIF (CD74^{-/-}) fenótipos

semelhantes ao camundongos deficiência de MIF (10-12), observações recentes levaram à hipótese de que pode haver um segundo ligante para CD74. Por exemplo, as células B deficientes em MIF são mais sensíveis à apoptose do que as células B do tipo selvagem, mas a magnitude desse defeito é duas vezes mais pronunciada em células deficientes em CD74.

Estudos anteriores hipotetizaram que essas observações podem ser explicadas por um segundo ligante tipo MIF, e consideramos um provável candidato a ser a proteína codificada pelo gene DDT, D-dopacromo tautomerase (D-DT). DDT e MIF mostram uma estrutura íntron-éxon conservada e suas regiões de codificação são altamente homólogas. Os genes para MIF e D-DT estão em estreita aposição entre si e com duas glutathion S-transferases de classe teta, sugerindo que esses agrupamentos de genes surgiram por um evento de duplicação ancestral.

A capacidade de tautomerizar o D-estereoisômero do dopacromo que não ocorre naturalmente, que é uma propriedade catalítica compartilhada com o MIF nomeou a molécula D-DT. Esta atividade foi hipotetizada para ser uma função vestigial que reflete a origem ancestral de MIF na resposta de encapsulamento melanótico de invertebrados (MERCK et al., 2011).

Uma estrutura cristalina de D-DT verificou sua similaridade 3D com MIF. Com exceção de estudos recentes indicando uma interação entre os genes MIF e DDT na expressão de fatores pró-angiogênicos e COX-2 em linhagens celulares de adenocarcinoma, não há estudos sobre as funções biológicas do D-DT. Neste relatório, descrevemos a caracterização funcional do D-DT humano e de camundongo. Foi identificado em estudos anteriores que o D-DT recombinante se liga com alta afinidade ao CD74, ativa a cascata de sinalização ERK1/2 MAP quinase e recapitula muitas das funções inflamatórias do MIF, incluindo a modulação da migração de macrófagos e imunossupressão induzida por glicocorticóides. A administração de um anticorpo anti-DDT, como o anti-MIF, protege camundongos do choque endotóxico letal, reduzindo os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-12p70 e IL-1 β) e aumentando a concentração circulante de a citocina anti-inflamatória, IL-10. Uma análise de amostras clínicas de pacientes com sepse ou câncer também revelou que D-DT é sistemicamente expresso e que os níveis circulantes se correlacionam com MIF e com a gravidade da doença inflamatória e malignidade (PASUPULETI et al., 2014).

Embora altamente eficazes, os anticorpos anti-MIF, em estudos experimentais, não inibem completamente as respostas de ativação celular dependentes de CD74 (MERCK et al., 2011).

É possível inibir o crescimento de células cancerosas direcionando DDT e MIF

com uma única molécula, o que pode proporcionar benefícios terapêuticos mais eficientes para pacientes com glioma (RAJASEKARAN et al., 2014), pois o inibidor duplo 4-iodo-6-fenilpirimidina (4-IPP) é capaz de direcionar MIF e DDT juntos e forma uma ligação covalente com Pro-1 de ambas as proteínas para alterar a estrutura e impedir a função (RAJASEKARAN et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

O fator de inibição da migração dos macrófagos (MIF), originalmente descrito como uma citocina de células T humanas que inibe a migração randômica de macrófagos e é considerado um importante fator no controle de infecção por diversos parasitas. Camundongos MIF nocaute são mais suscetíveis a infecção por *T. gondii* quando comparados com o tipo selvagem. Atualmente, inúmeras outras atividades biológicas tem sido descritas para esta citocina, que apresenta ampla distribuição no organismo. Entretanto, a função primordial de MIF relacionada a atividade de macrófagos tem sido pouco estudada. Assim, entender se MIF participa no processo de polarização de macrófagos nos permitirá compreender um pouco mais sobre a atividade biológica desta citocina e compreender o mecanismo de ação da mesma no controle da infecção por *T. gondii*. Tais abordagens podem oferecer novas perspectivas sobre o papel imunológico de MIF na geração de microambientes capazes de determinar fenótipos e funções dos macrófagos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a possível participação de MIF nos processos de diferenciação de macrófagos peritoneais e de medula provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} infectados por *Toxoplasma gondii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o índice de invasão de *T. gondii* em macrófagos peritoneais e de medula provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} machos e fêmeas.
- Comparar o índice de proliferação de *T. gondii* em macrófagos peritoneais e de medula provenientes de animais C57bl/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} machos e fêmeas.
- Determinar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e de medula provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} fêmeas.
- Determinar a capacidade de *T. gondii* de lisar macrófagos provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} fêmeas.
- Mensurar a atividade de uréia em macrófagos provenientes de animais C57BL/6 WT em e C57BL/6 MIF^{-/-} fêmeas.
- Verificar se MIF influencia nas vias de sinalização intracelular e expressão de proteínas inflamatórias e antiinflamatórias.
- Comparar a secreção de citocinas de perfil Th1/Th2/Th17 em macrófagos provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} fêmeas.
- Comparar a secreção de nitrito em macrófagos provenientes de animais C57BL/6 WT e C57BL/6 MIF^{-/-} fêmeas.
- Verificar se MIF influencia no processo de polarização de macrófagos para a subpopulação de macrófagos classicamente ativada-M1 e macrófagos ativados alternativamente-M2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Submissão e aprovação do Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) e aprovado segundo protocolo 020/18. Portanto, os experimentos envolvendo animais MIF nocaute (MIF^{-/-}) foram desenvolvidos na UFU. Esta Instituição possui autorização da CTNBio para realização de experimentos com camundongos nocautes para MIF – Certificado de Qualidade em Biossegurança: CQB 163/02.

4.2 Obtenção dos animais

Foram utilizados neste estudo camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 WT (tipo selvagem) e C57BL/6 MIF^{-/-} (nocautes para MIF). Os animais foram mantidos na Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia/Brasil (REBIR/UFU), em condições padrão: ciclo claro/escuro de 12h e com livre acesso a ração e água. Este estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética Experimental Animal da UFU (CEUA/UFU) sob protocolo número 020/18.

4.3 Obtenção e cultura de células

4.3.1 Macrófagos Peritoneais

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal em camundongos C57BL/6 fêmeas WT (tipo selvagem) e MIF^{-/-} (nocautes para MIF). Os animais receberam 1mL de solução de tioglicolato na cavidade peritoneal para recrutamento de macrófagos. Três dias após os animais foram eutanasiados para a coleta de macrófagos. A cavidade peritoneal dos animais foi lavada usando-se seringa e agulha 22G para injeção de 5mL de meio de cultura RPMI 1640 gelado. A seguir, o meio RPMI contendo macrófagos foi removido da cavidade peritoneal e, posteriormente transferidos para tubos Falcon de 15ml para centrifugação a 400g por 10 min a 4°C. O processo foi realizado mais uma vez para lavagem das células e ressuspensos em 5ml de RPMI a 10% SFB para contagem dos mesmos em câmara de Neubauer sendo que células mortas foram excluídas pela coloração com azul de tripan. A seguir os macrófagos

foram plaqueados sob diferentes condições experimentais e incubados na estufa à 37°C 5% de CO₂ para aderência na placa.

4.3.2 Obtenção de sobrenadante de L929 (Hibridoma produtor de fator diferenciados de macrófagos)

Foram colocadas em cultura, células L929 (Hibridoma produtor de fator diferenciados de macrófagos) para obtenção do sobrenadante das mesmas e posterior produção do meio de diferenciação de macrófagos. Quando a cultura de L929 formou uma camada de células uniforme por toda a garrafa de 75cm² sem filtro, foram adicionados 50 ml de RPMI suplementado com 10% de SFB e a garrafa foi deixada em estufa de CO₂ a 5%, 37°C com a tampa fechada por 7 dias. Após esse período, o sobrenadante da cultura de L929 foi recolhido com o auxílio de uma pipeta sorológica e transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 400g por 5 minutos para remoção de debris celulares. Cada 15ml do sobrenadante de L929 foi armazenado em tubo Falcon de 50 ml e congelado em freezer -70°C para posterior produção do meio de diferenciação dos macrófagos de medula. A mesma garrafa de células L929 pode ser utilizada apenas duas vezes para produção do sobrenadante. No dia do experimento de retirada das células de medula, o sobrenadante de L929 é descongelado para a produção do meio de diferenciação no momento de plaquear as células.

4.3.3 Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea

Para extração de células da medula para posterior diferenciação em macrófagos, foram retirados os fêmures e tíbias de 6 camundongos C57BL/6 fêmeas WT (tipo selvagem) e MIF^{-/-} (nocautes para MIF). Posteriormente ficaram imersos durante 5 min em álcool 70% na placa de petri. A fim de obter o máximo de células da medula, foram cortadas as epífises de ambas as extremidades e, com o auxílio de uma seringa de 5mL aplicou-se RPMI não suplementado para lavagem da medula e retirada das células. As células obtidas do lavado foram colocadas em tubo falcon já contendo meio RPMI, e posteriormente centrifugadas a 400g, 5 min e a temperatura ambiente. O sedimento obtido foi ressuspensão em meio RPMI não suplementado dissociando levemente os grumos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e a suspensão ajustada para 2 X 10⁶ células por placa de petri contendo 10 ml de meio

de cultura para diferenciação de macrófagos (5 ml de RPMI incompleto + 2 ml de RPMI 20% SFB + 3ml de sobrenadante de L929). Logo após, as placas foram colocadas em estufa de CO₂ a 5%, 37°C e umidificada. Após 96 horas de cultura adicionou-se mais 10 ml de meio de diferenciação de macrófagos em cada placa de petri retornando as mesmas para estufa onde permaneceram por mais 72 horas. Após esse período, todo o sobrenadante das placas de petri poderá ser removido com o auxílio de uma pipeta sorológica e descartado pois os macrófagos diferenciados estão totalmente aderidos à placa e já podem ser removidos das mesmas com RPMI incompleto gelado e o auxílio de um “cell scraper”. As placas de petri contendo as células removidas foram lavadas e esta solução foi transferida para um tubo falcon e a suspensão obtida foi centrifugada a 400g, 5min a temperatura ambiente e ressuspensa em meio RPMI 10% SFB para contagem dos mesmos em câmara de Neubauer sendo que células mortas foram excluídas pela coloração com azul de tripan. A seguir os macrófagos foram plaqueados sob diferentes condições experimentais e incubados na estufa à 37°C 5% de CO₂ para aderência na placa de cultura.

4.3.4 Células Hela

Utilizou-se a linhagem de células epiteliais uterinas humanas (HeLa) obtidas do Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM/UFU) e mantida em cultura no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas Naturais (ICBN/UFTM). As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular de 25 ou 75cm² (Nunc™ Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) em meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de SFB, sendo incubados em estufa umidificada à temperatura de 37 °C e 5% de CO₂. O repique das células foi efetuado a cada 48 horas, prosseguindo-se resumidamente da seguinte forma: o meio de cultura já metabolizado pelas células foi retirado dos frascos de cultivo e, logo em seguida, as células foram incubadas com 400 a 1000 µL de solução de tripsina, por 5 minutos em estufa de cultivo. Após a ação da tripsina, foi adicionado meio novo ao frasco de cultivo, para inativação da tripsina, e a suspensão de células foi retirada dos frascos e transferida para tubo Falcon de 15 mL e centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. O “pellet” formado foi ressuspendido em 1 mL de meio e distribuído em novas garrafas de cultura para a realização dos

experimentos.

4.3.5 Manutenção in vitro da cepa RH de *T. gondii* e infecção experimental

Foram utilizados taquizoítos da cepa RH do parasito *T. gondii* e também do clone 2F1 de RH que expressa o gene da enzima β -galactosidase (SEEBER; BOOTHROYD, 1996), gentilmente cedidos pelo professor Dr. Vernon B. Carruther da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos na linhagem de células epiteliais uterinas humanas (HeLa) e cultivadas de forma similar às células Hela, contudo, em meio RPMI 1640 a 2% de SFB. Os parasitos foram mantidos por passagem seriada em intervalos de 48 horas, sendo distribuídos em novos frascos de cultivo contendo monocamadas de células HeLa não infectadas, para a garantia do ciclo lítico do *T. gondii*, e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para o processo de infecção experimental de macrófagos, as células HeLa contendo taquizoítos intracelulares de *T. gondii* foram removidas dos frascos de cultura com auxílio de cell scraper (TPP®, Suíça) e transferidas para um tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, a solução de células foi submetida a passagens mecânicas em seringas acopladas com agulhas de 21 e 26 gauges, respectivamente, para lisar as células e assim liberar os parasitos de seu interior. O lisado resultante foi centrifugado a 500 rpm por 3 minutos, para remoção de debris celulares e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos para recolher os parasitos livres. O sedimento de parasitos resultante foi ressuscitado em meio a 2% de SFB e posteriormente, foi pipetado 10 μ L da solução de parasitos em um microtubo de 100 μ l, acrescentando-se 10 μ L de azul de tripan, sendo que 10 μ L dessa mistura foi colocada na câmara de Neubauer para contagem dos parasitos a serem utilizados nas infecções dos experimentos que se seguiram. A realização desse procedimento teve por objetivo a obtenção de taquizoítos extraídos simultaneamente de suas células hospedeiras, visto que apresentariam taxas de viabilidade semelhantes, tornando-os viáveis para serem utilizados nos experimentos, se comparados aos parasitos liberados de forma espontânea de suas células.

5. Preparo do meio de diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea

No momento da experimentação para diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea, deve ser preparado o meio de diferenciação dessas células. Para o preparo desse meio, foi retirado o sobrenadante de L929 do freezer -70°C e, juntamente com os 15ml de L929 ainda congelado, foram adicionados 25 mililitros de meio de cultura RPMI incompleto e 10 mililitros de meio de cultura RPMI completo suplementado com 20% de soro fetal bovino. Posteriormente, o meio de cultura para diferenciação de macrófagos é filtrado em filtro de 0,22 micrômetros com auxílio da seringa de 20 mililitros, armazenado e identificado com nome, data e pesquisador responsável em freezer -20°C até o momento do uso.

6. Preparação do tratamento utilizado nos macrófagos 4-IPP (4-iodo-6-phenylpyrimidine) – Inibidor do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) e D-dopacromo tautomerase (D-DT)

O tratamento foi preparado de acordo com instruções do fabricante em quatro diferentes concentrações para tratamento das células e posterior verificação da viabilidade das mesmas. Tais concentrações foram: 5uM, 10uM, 25uM e 50uM.

Para o preparo do inibidor nas concentrações propostas pelo trabalho, inicialmente utilizamos da concentração contida na bula para calcularmos a molaridade.

A partir da molaridade calculada, utilizamos cada concentração a ser utilizada para calcularmos quanto o mesmo precisa ser diluído em cada uma delas, contidas na tabela a seguir:

Concentração Utilizada	50uM	25uM	10uM	5uM
Molaridade	$\frac{35450}{50}$ ↷	$\frac{35450}{25}$ ↷	$\frac{35450}{10}$ ↷	$\frac{35450}{5}$ ↷
Nº vezes p/ diluir	709x	1418x	3545x	7090x

O inibidor foi diluído em DMSO (0,14%).

7. Ensaio de Viabilidade com Alamar Blue – Resazurina

A verificação da viabilidade celular dos macrófagos foi feita de acordo com o protocolo do ensaio fluorimétrico com resazurina. Alamar Blue, também conhecido

como resazurina, é um indicador de oxirredução que atravessa a membrana de células vivas. A resazurina quando dissolvida em tampões fisiológicos forma uma solução de cor azul escuro. Células viáveis e com metabolismo ativo reduzem a resazurina a uma outra substância, a resorufina, que apresenta cor rosa e emite fluorescência. A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, o que pode ser quantificado por meio de fluorescência ou por meio de absorbância. Após aplicar a solução de resazurina, as células devem ficar incubadas com a mesma o tempo suficiente de acordo com a atividade metabólica de cada tipo celular (RISS et al., 2016). Para a realização do ensaio de viabilidade, os macrófagos de camundongos WT e MIF^{-/-} foram plaqueados em placa de 96 poços durante 24 horas em 200 uL de meio RPMI contendo macrófagos. Depois, foi realizado o tratamento com o inibidor 4-Iodo-6-fenilpirimidina (4-IPP), (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 μM em DMSO e diluídas em RPMI durante mais 24 horas. Macrófagos controle não foram tratados ou tratados com DMSO (0,14%) em RPMI. Após 24 horas de tratamento, foi adicionado 20 uL(44 μM) de Resazurina e incubados por 4 horas. A leitura da fluorescência foi realizada nos comprimentos de onda de 560 e 590 nm utilizando o leitor de microplacas de fluorescência. A viabilidade relativa foi calculada com base em macrófagos não tratados que foram considerados como 100% de viabilidade.

8. Ensaios de invasão e proliferação intracelular de *T.gondii*

Os macrófagos peritoneais e de medula (1×10^5 células/200 μL /poço) foram cultivados em microplacas de cultura de 96 poços contendo meio RPMI e 10 % de SFB e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A seguir os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações (5, 10 e 25 $\mu\text{mol/L}$) do inibidor de D-DT (4-IPP: 4-iodo-6-fenilpirimidina). Controles não tratados foram incubados com meio de cultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram infectadas na proporção de 5 taquizoítas do clone 2F1 da cepa RH de *T. gondii* por célula em meio RPMI e 2% de SFB por 30 minutos e 3 horas, para avaliar a invasão de *T. gondii* (BARBOSA et al., 2012) ou por 24 horas para avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* (CASTRO et al. 2013). Após o período de 30 min de infecção, as placas foram lavadas com o próprio meio de cultura para retirada dos parasitos que não invadiram as células e para que permaneçam somente as células infectadas. O

sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C para posterior análise do perfil de citocinas. Os macrófagos infectados foram, então, lisados e a invasão dos parasitos foi quantificada através do ensaio colorimétrico da β -galactosidase (TEO et al., 2007; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015). Nesse ensaio, é realizada a lise celular para que os parasitos fiquem expostos ao reagente CPRG e, então, a enzima citoplasmática β -galactosidase, expressa pelos taquizoítos do clone 2F1, converte o substrato CPRG (clorofenol red – β – D – galactopiranosídeo; Roche) de coloração amarelo-laranja em galactose e o cromóforo vermelho clorofenol, desenvolva uma coloração vermelho-escuro no meio. A intensidade de cor corresponde, portanto, à atividade enzimática da β -galactosidase e constitui uma medida indireta para a determinação quantitativa do número de parasitos (Quanto maior a intensidade da coloração, maior a atividade enzimática). Para avaliação da proliferação dos parasitos no interior dos macrófagos após os períodos de 3 e 24 horas, as placas foram centrifugadas a 250g, por 5 min, TA para que todos os parasitos ficassem no fundo da placa e pudesse coletar o sobrenadante para também armazenar em freezer -80°C e, posteriormente, analisar a produção de citocinas. Feito isso, o processo de reação enzimática segue o mesmo protocolo acima explicado para análise de invasão dos parasitos. A invasão e proliferação de *T. gondii* (número total de taquizoítas) foi obtida relacionando-se o número de taquizoítas obtidos com uma curva padrão de referência contendo taquizoítas livres (1×10^6 a 15.6×10^3) e a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570nm utilizando leitor de microplacas de fluorescência. Os dados foram expressos como número de taquizoítas e foram realizados três experimentos independentes com nove replicatas.

9. Ensaio de fagocitose de *T. gondii* em macrófagos por ensaio colorimétrico da beta-galactosidase

Para o ensaio de fagocitose, taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) foram previamente fixados em paraformaldeído 4% em PBS durante 30min. Em seguida, os parasitos fixados foram lavados 3 vezes em PBS e então adicionados aos macrófagos MIF^{-/-} e WT previamente tratados com 4-IPP (1×10^5 macrófagos e 5×10^5 taquizoítos/200 μL /poço), conforme descrito acima. Os parasitos foram incubados com células as durante 30min, a 37°C , com 5% de CO_2 . Em seguida, os sobrenadantes foram removidos; a camada de macrófagos foi lavada com PBS para remover os

parasitas não fagocitados. Os parasitas fagocitados foram quantificados utilizando o ensaio de β -galactosidase modificado de TEO e colaboradores (2007). Resumidamente, os macrófagos foram lisados com tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) [50 mmol/L de cloridrato de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (p/v) desoxicolato de sódio e 0,1 % (p/v) SDS; pH 7,5] durante 12h. Em seguida, foram adicionados ao lisado, o tampão de ensaio (tampão fosfato 100 mM, pH 7,3, β -mercapto-etanol 102 mM e MgCl₂ 9 mM) e o substrato CPRG 6,25 mM (vermelho de clorofenol- β -D-galactopiranosídeo; Roche, Indianapolis, IN). Os dados de *T. gondii* fagocitados foram expressos em número de taquizoítos calculado em relação à curva de referência da linhagem 2F1 ($1,5 \times 10^4$ a 1×10^6) previamente fixados em paraformaldeído 4%. A atividade enzimática de β -galactosidase foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas de absorvância. Três experiências independentes foram realizadas em triplicata.

10. Ensaio de fagocitose com partículas de Zimosan

Para o ensaio fagocítico de zimosan, macrófagos MIF^{-/-} e WT foram plaqueados sob lamínulas redondas em placas de 24 poços (1×10^5 células/200 μ L/poço) em meio RPMI suplementado com 10% de FBS. Os macrófagos foram incubados a 37°C e 5% de CO₂ em incubadora umidificada por 24h. Em seguida, as células foram tratadas ou não com 4-IPP (5, 10 e 25 μ M) por mais 24h. O meio foi removido e em seguida partículas de zimosan (5 partículas por célula) foram adicionadas aos macrófagos e as células foram incubadas durante 3h. Depois, o sobrenadante foi removido; os macrófagos foram lavados com PBS e depois fixados com formaldeído 3,7% em PBS e corados com Giemsa. O número de partículas englobadas foi contado em 200 células contendo partículas. Além disso, a quantidade de células contendo partículas de zimosan foi quantificada em um total de 200 macrófagos. Três experiências independentes foram realizadas em triplicado.

11. Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas nos sobrenadantes dos ensaios de invasão e proliferação de macrófagos peritoneais e de medula armazenados em freezer -80°C foi realizada utilizando o CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) de acordo com as

instruções do fabricante, e as seguintes citocinas foram mensuradas: TNF- α , IL-10, IL-6, IL-17 e IFN- γ . Resumidamente, sobrenadantes de macrófagos derivados de camundongos C57BL/6 fêmeas, tratados com 4-IPP e cultivados com *T. gondii*, foram incubados com esferas acopladas a anticorpos monoclonais específicos e anticorpos secundários por 4 h em temperatura ambiente. As esferas foram lavadas e a aquisição realizada no citômetro de fluxo Accuri fluxo BD™ (FACSCalibur, BD Company, San Diego, CA, Estados Unidos). A concentração das amostras foi estimada comparando a fluorescência obtida a partir da curva padrão obtida por diluição em série de citocinas murinas recombinantes. Os dados foram registrados pelo software BD™ Cell Quest. Os dados foram expressos em pg/mL.

Para dosagem de MIF, foi utilizado um Kit (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Oxford, England). A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante para ELISA sanduíche. Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpo de captura, bloqueadas e incubadas com as amostras ou com a respectiva citocina recombinante para a construção da curva padrão. Posteriormente, após lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com anticorpo de detecção biotilado específico para MIF. O ensaio foi realizado utilizando estreptavidina acoplada peroxidase (HRP) e revelado com 3'3'-5'5 tetrametilbenzidina (TMB). A concentração de MIF foi determinada pela extrapolação da curva padrão em concentração conhecida da mesma.

12. Quantificação de uréia

As concentrações de uréia em amostras de sobrenadante foram determinadas por meio de ensaio colorimétrico enzimático (Gold Analisa Ltda, Belo Horizonte, Brasil). O método foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, amostras (10 μ L) foram incubadas com urease tamponada (1mL) por 5 min a 37°C. Em seguida, foi adicionado oxidante (1mL) e incubado novamente por 5 min a 37°C. A absorbância foi lida a 600 nm e as concentrações de uréia foram determinadas usando uma solução padrão de uréia.

13. Quantificação de óxido nítrico (NO)

A produção de nitrito pelos macrófagos foi medida pelo método de Griess modificado de

acordo com as recomendações do fabricante (G4410, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). Resumidamente, as amostras de sobrenadante (100 μ L) e uma curva padrão de nitrito de sódio foram plaqueadas em placa de 96 poços e foram adicionados 100 μ L/poço de reagente de Griess modificado. A reação foi realizada por 15 min à temperatura ambiente, então a absorbância foi lida em 540 nm e as concentrações de NO da amostra foram determinadas usando a curva padrão.

14. Análises estatísticas e construção de gráficos de radar

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism, 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média (DP) (*pool* de macrófagos de 6 animais/grupo foram usados para 6 repetições para cada conjunto de ensaios). Two Way ANOVA seguido por testes de comparações múltiplas de Dunnett's e Tukey foram usados para comparações entre grupos tratados e não tratados e para grupos WT e MIF^{-/-}, respectivamente. O teste t-Student's foi usado para comparação entre dois conjuntos de dados. Finalmente, o One Way ANOVA seguido foi aplicado para analisar o ensaio de viabilidade. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Além disso, gráficos de radar foram construídos para resumir os produtos de secreção dos macrófagos. Para atingir este objetivo, todo o universo de dados de cada fator solúvel de macrófagos foi utilizado para determinar o valor mediano global. Esses dados foram utilizados para categorizar os macrófagos em baixos e altos secretores dos fatores analisados nos grupos MIF^{-/-} e WT, de acordo com o nível de corte estabelecido de cada produto secretado. Os desenhos gráficos foram construídos usando o software Microsoft Excel (Microsoft Corp., EUA).

5. RESULTADOS

5.2 RESULTADOS PARTE I

Afim de determinar o sexo de camundongos C57BL6 e a origem dos macrófagos a serem utilizados nos experimentos posteriores, utilizamos machos e fêmeas nos ensaios de invasão e proliferação.

5.2.1 O sexo de camundongos C57BL6 influencia no parasitismo de macrófagos peritoneais e de medula

Inicialmente avaliamos o parasitismo através de invasão e proliferação de macrófagos peritoneais e de medula derivados de fêmeas e machos WT e MIF^{-/-} ambos infectados pelo *T. gondii*. Nossos resultados demonstraram que após 30 minutos de infecção de macrófagos peritoneais, houve uma invasão significativamente maior em macrófagos derivados de fêmea WT quando comparados com macho WT por *T.gondii*. Quando analisados entre macrófagos derivados de macho WT e MIF^{-/-} e macrófagos derivados de fêmea WT e MIF^{-/-} em ambos os grupos houve uma invasão significativamente maior nos grupos WT (**Figura 3A**). Após 3 horas de infecção de macrófagos peritoneais não foram observadas diferenças significativas (**Figura 3B**). Após 24 horas de infecção, analisamos a proliferação de *T.gondii* nos macrófagos peritoneais. Foi observada uma proliferação de *T.gondii* significativamente maior em macrófagos derivados de macho WT quando comparados com fêmea WT (**Figura 3C**).

Quando avaliamos o parasitismo em macrófagos de medula, após 30 minutos de infecção, houve uma invasão significativamente maior em macrófagos derivados de fêmea WT quando comparados com macho WT por *T.gondii*. Essa diferença também foi vista entre os grupos de macrófagos de medula derivados de fêmea MIF^{-/-} quando comparados com macho MIF^{-/-}. Ainda na mesma figura, vimos diferença significativa nos grupos de fêmeas, na qual a invasão foi maior no grupo WT quando comparado com o MIF^{-/-} (**Figura 3D**). Após 3 horas de infecção de macrófagos de medula não foram observadas diferenças significativas (**Figura 3E**). Após 24 horas de infecção, analisamos a proliferação de *T.gondii* também nos macrófagos de medula. Foi observada uma proliferação de *T.gondii* significativamente maior em macrófagos derivados de fêmea WT quando comparados com macho WT (**Figura 3F**).

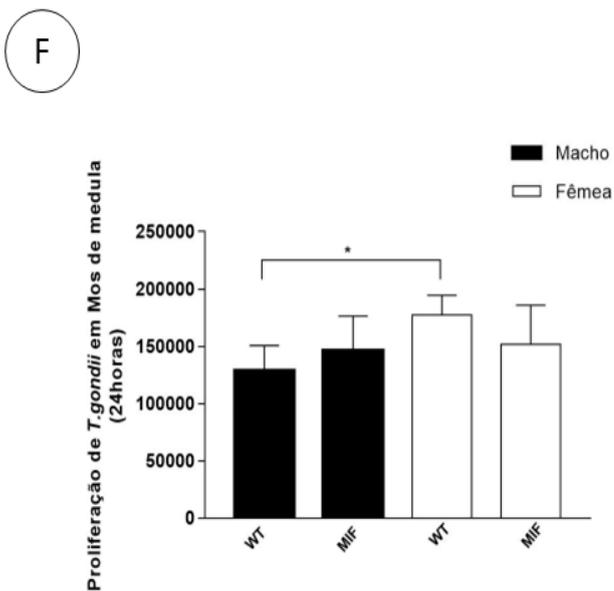
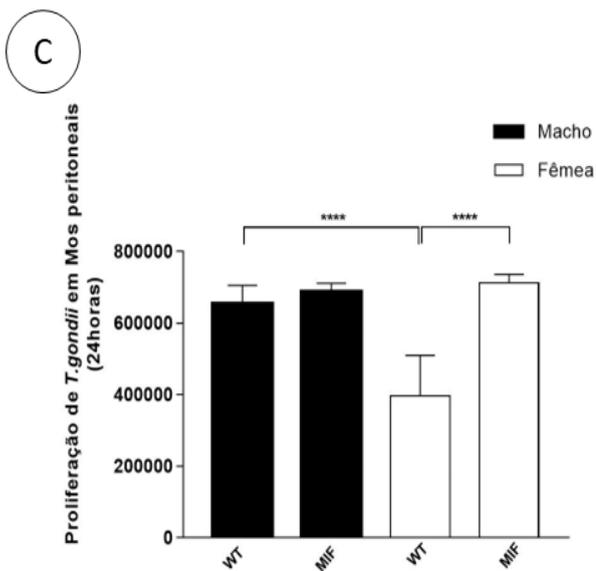
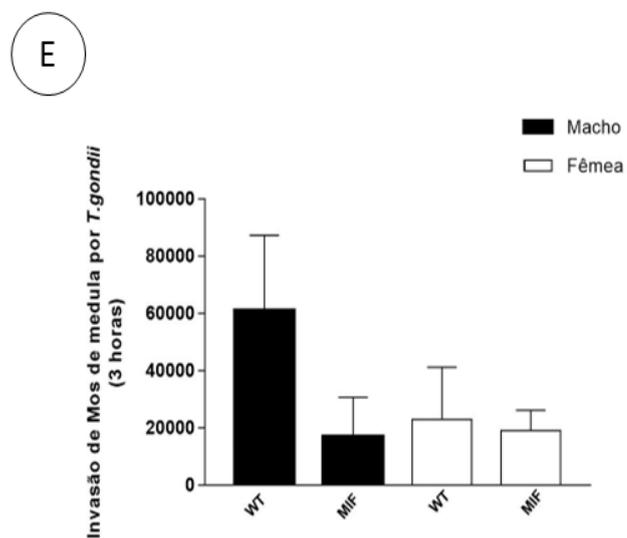
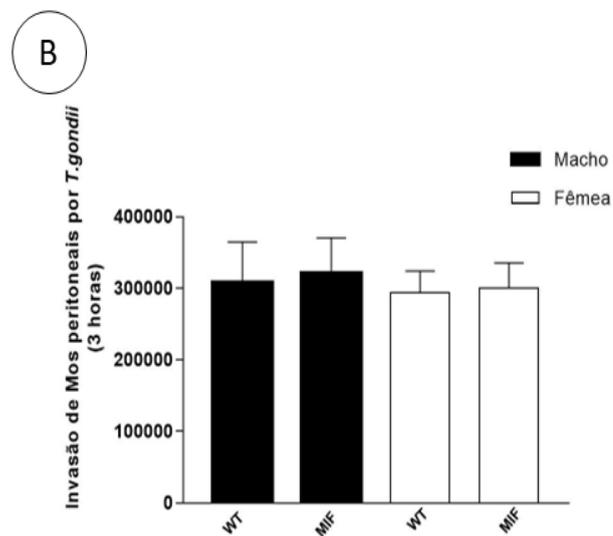
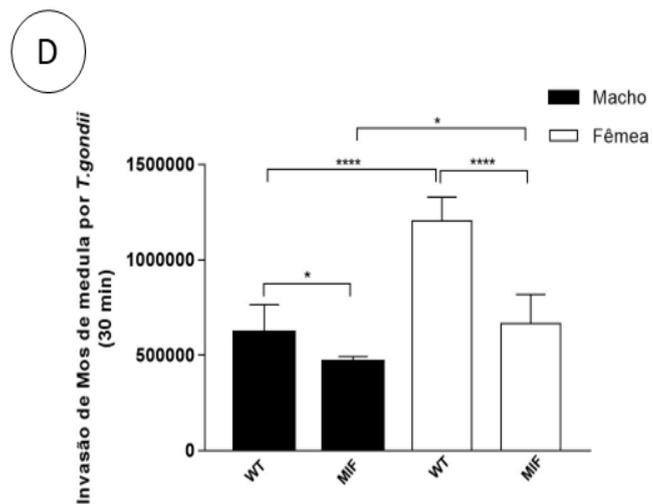
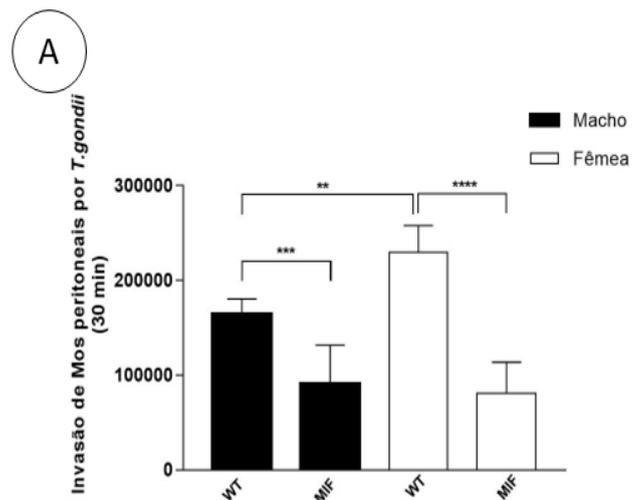


Figura 3: Invasão e proliferação de macrófagos peritoneais e de medula derivados de fêmeas e machos WT e MIF^{-/-} ambos infectados pelo *T. gondii*. Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços e depois foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1, 5 parasitas/célula). No ensaio de invasão (A e B), após o período de 30 min de infecção, as placas foram lavadas com o próprio meio de cultura para retirada dos parasitos que não invadiram as células e para que permanecessem somente as células infectadas. Os macrófagos infectados foram, então, lisados e a invasão dos parasitos foi quantificada através do ensaio colorimétrico da β -galactosidase. Para o ensaio de proliferação (C) de *T.gondii* (24h), as placas foram centrifugadas (250x g, 5 min, RT) para sedimentar os parasitas que eventualmente lisaram as células. Em seguida, os macrófagos infectados foram lisados usando tampão RIPA e os parasitas foram quantificados usando ensaio de β -galactosidase. O parasitismo foi avaliado posteriormente em macrófagos de medula. Após 30 minutos de infecção de macrófagos de medula, houve uma invasão significativamente maior em macrófagos derivados de fêmea WT quando comparados com macho WT por *T.gondii*. Essa diferença também foi vista entre os grupos de macrófagos de medula derivados de fêmea MIF^{-/-} quando comparados com macho MIF^{-/-}. Ainda na mesma figura, vimos diferença significativa nos grupos de fêmeas, na qual a invasão foi maior no grupo WT quando comparado com o MIF^{-/-} (D). Após 3 horas de infecção de macrófagos de medula não foram observadas diferenças significativas (E). Após 24 h de infecção, analisamos a proliferação de *T.gondii* também nos macrófagos de medula. Foi observada uma proliferação de *T.gondii* significativamente maior em macrófagos derivados de fêmea WT quando comparados com macho WT (F). O parasitismo foi expresso como o número de taquizoítos calculado com base em uma curva de referência de taquizoítos ($1,5 \times 10^4$ a 1×10^6). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. *Diferenças significativas entre camundongos MIF^{-/-} e WT na mesma condição experimental (*P<0,05; **P<0,01). #Comparações entre macrófagos machos e fêmeas dentro do mesmo grupo (##P< 0,01, ####P< 0,0001). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.2.2 A intensidade da atividade fagocítica de acordo com a origem dos macrófagos murinos

A fim de avaliar a atividade fagocítica dos macrófagos, foi realizado o ensaio de fagocitose de *T. gondii* em macrófagos WT de origem peritoneal e macrófagos WT derivados da medula óssea. Durante o ensaio, os macrófagos são infectados com o parasito previamente fixado com paraformaldeído na proporção de 5 taquizoítas do clone 2F1 da cepa RH de *T. gondii* por

célula. Os mesmos foram incubados por 30 minutos para que acontecesse a fagocitose dos parasitos. A seguir, as células foram lavadas para remoção de parasitos não internalizados. Como os parasitos foram previamente fixados, foi realizada lise celular após um período de 12 horas para que a quantidade de parasitos fagocitados fosse mensurada por ensaio colorimétrico da beta-galactosidase. Os resultados mostraram que os macrófagos WT peritoneais realizam uma atividade fagocítica de intensidade significativamente maior do que macrófagos WT derivados de medula óssea (**Figura 4**).

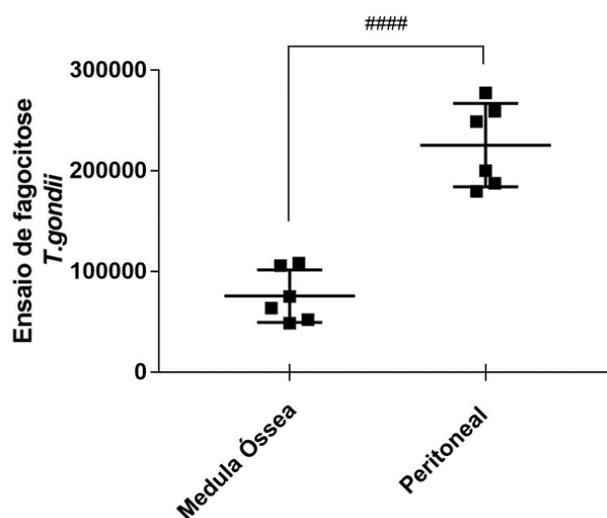


Figura 4: Avaliação da atividade fagocítica em macrófagos WT de origem peritoneal e macrófagos WT derivados da medula óssea infectados com *T. gondii*. O parasitismo foi expresso como o número de taquizoítos calculado com base em uma curva de referência de taquizoítos ($1,5 \times 10^4$ a 1×10^6). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. #Diferenças significativas entre macrófagos WT peritoneais e macrófagos WT derivados de medula óssea. (# $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; #### $P < 0,0001$). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.2.3 A modulação gerada por *T.gondii* é dependente da origem dos macrófagos

A fim de avaliar a intensidade da atividade de *T.gondii*, o ensaio de proliferação de *T. gondii* foi realizado em macrófagos WT e MIF^{-/-}. O ensaio de proliferação, analisado 24h após a infecção, mostrou que *T. gondii* invade e prolifera mais em macrófagos peritoneais do que em macrófagos derivados da medula óssea. (Figura 5).

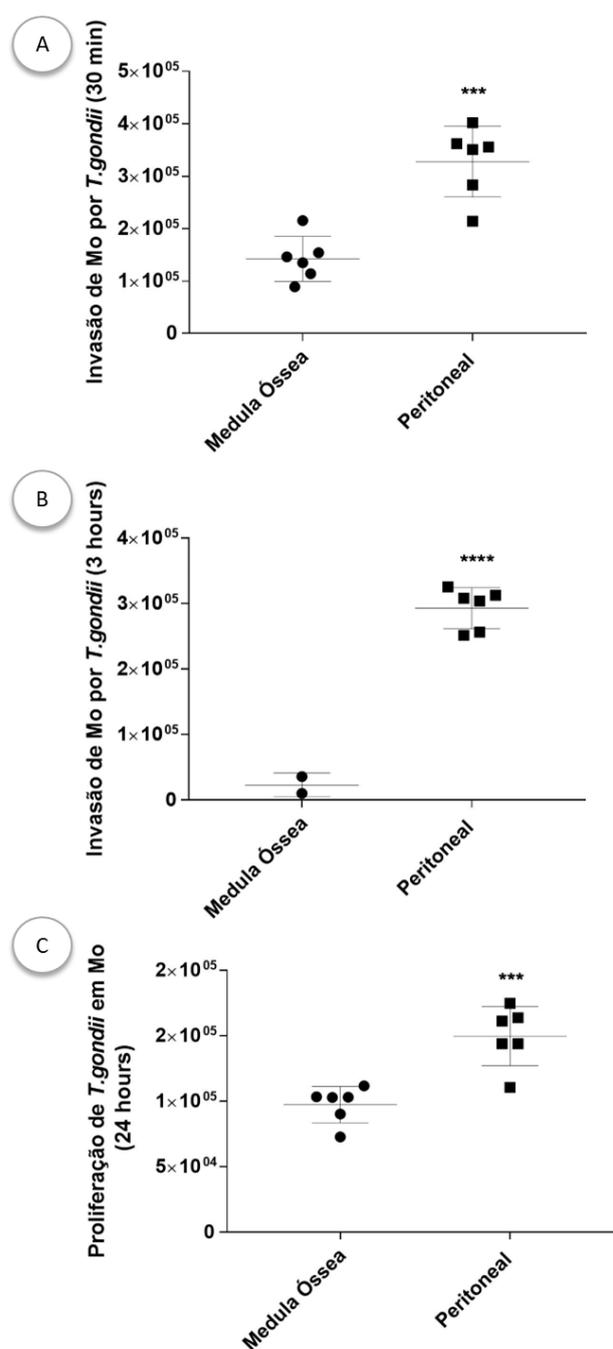


Figura 5: Avaliação intensidade da atividade de *T.gondii* em macrófagos WT de origem peritoneal e macrófagos WT derivados da medula óssea infectados com *T. gondii*. O parasitismo foi expresso como o número de taquizoítos calculado com base em uma curva de referência de taquizoítos ($1,5 \times 10^4$ a 1×10^6). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata

usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. *Diferenças significativas entre macrófagos WT peritoneais e macrófagos WT derivados de medula óssea. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.2.4 A presença de infecção por *Toxoplasma gondii* modifica a produção de citocinas por macrófagos peritoneais e de medula

O perfil de citocinas Th1, Th17 e Th2/Treg foi analisado para avaliar a influência da infecção por *T. gondii* em macrófagos WT peritoneais e de medula. Usamos macrófagos de camundongos C57BL6 WT não infectados e infectados por *T. gondii*. Considerando as citocinas dos perfis Th2/Treg, apenas IL-10 foi detectada. A IL-10 não foi detectada em macrófagos peritoneais e de medula não infectados de camundongos WT. No entanto, a infecção por *T. gondii* estimulou a produção de IL-10 nestas células. A produção de IL-10 em macrófagos WT de medula infectados foi significativamente maior do que em macrófagos WT peritoneais infectados (**Figura 6A**).

A secreção de IL-6 também foi estimulada somente quando houve a infecção por *T.gondii*. A comparação entre WT infectado de medula e WT infectado peritoneal mostrou que as células WT de medula infectados produziram uma quantidade significativamente maior de IL-6 do que WT peritoneal infectados (**Figura 6B**).

A citocina IL-17 também foi secretada somente em resposta à infecção por *T.gondii*. Não houve produção de IL-17 em macrófagos WT infectados de medula. E, quando comparada com a produção em macrófagos WT peritoneais infectados, a produção de IL-17 foi significativamente maior em macrófagos peritoneais infectados (**Figura 6C**).

A produção de TNF também ocorreu somente quando as células foram infectadas por *T.gondii*. Macrófagos WT peritoneais infectados têm concentrações significativamente mais altas de TNF do que em macrófagos WT de medula infectados (**Figura 6D**).

A infecção por *T.gondii* estimulou a secreção de IFN- γ em macrófagos WT infectados. Os macrófagos WT de medula infectados apresentaram uma concentração de IFN- γ significativamente maior do que macrófagos WT peritoneais infectados (**Figura 6E**).

Quando a citocina MIF foi analisada em macrófagos WT peritoneais e de medula, nossos resultados mostraram que os macrófagos controle (não infectados) tanto peritoneal quanto de medula apresentaram produção dessa citocina assim como os macrófagos infectados por *T.gondii* de ambos os grupos. No entanto, macrófagos WT peritoneais infectados com *T. gondii* apresentou uma produção significativamente maior de MIF em comparação com macrófagos WT de medula infectados (**Figura 6F**).

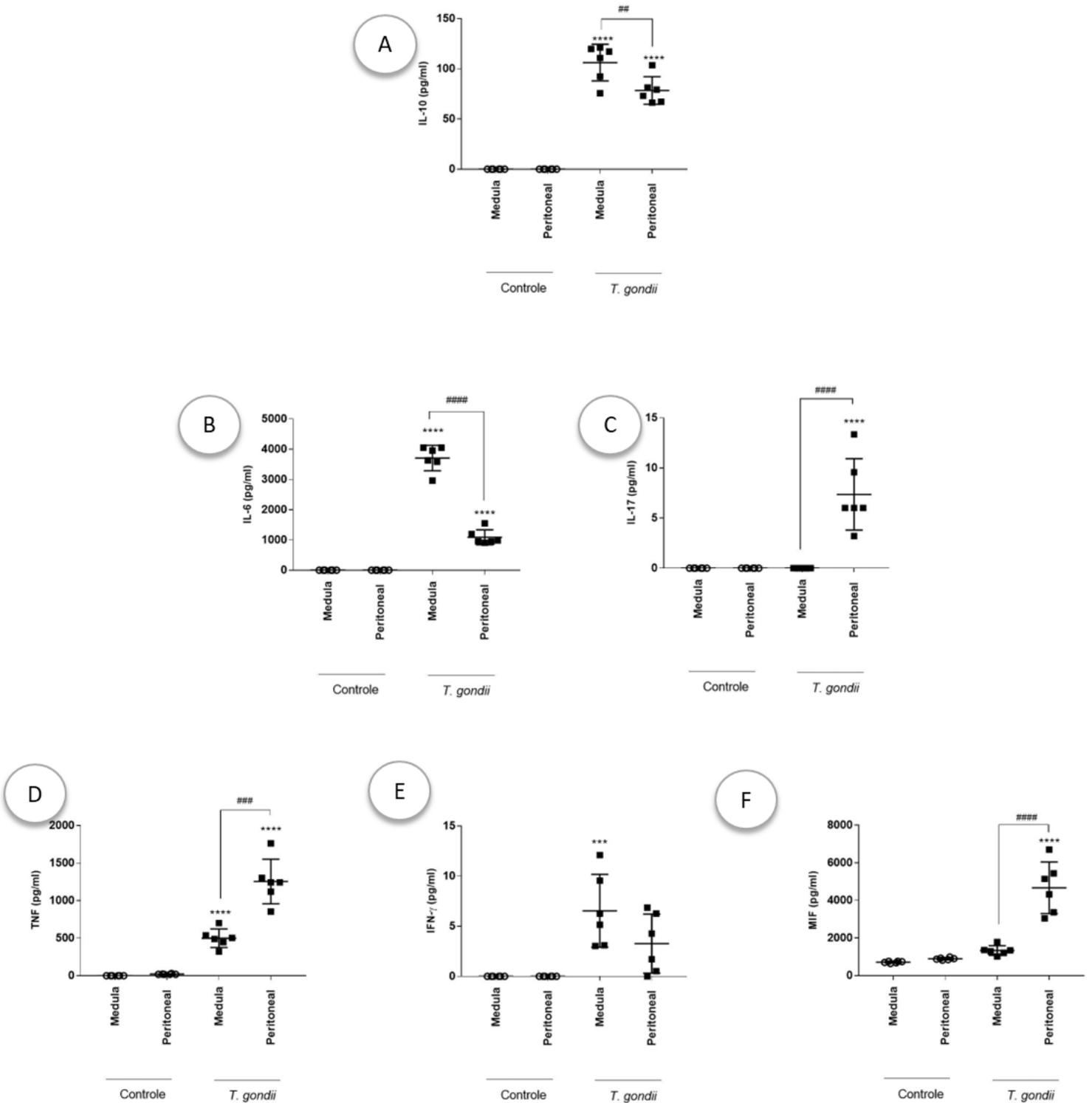


Figura 6: ELISA e quantificação de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* - CBA) para quantificar citocinas em sobrenadantes de macrófagos de C57BL/6 WT de medula e peritoneais. Os macrófagos foram infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) e incubados por 24h. Foram coletados sobrenadantes dos mesmos e usados para quantificação de citocinas. Dados representativos de um experimento realizado com 6 repetições e foram apresentados em média e EPM da quantidade de citocinas (pg/mL) secretadas de um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. (A) IL-10, (B) IL-6, (C) IL-17,

(D) TNF, (E) IFN- γ , (F) MIF. *Diferenças significativas entre camundongos WT de medula e peritoneais na mesma condição experimental (#P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,0001). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's. IL-10, TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17 foram medidos por CBA, enquanto MIF foi medido por ELISA.

5.2.5 Níveis mais altos de uréia e nitrito foram detectados em macrófagos peritoneais

A fim de avaliar o perfil de ativação em macrófagos peritoneais e de medula, os níveis de ureia e óxido nítrico foram mensurados em sobrenadantes de macrófagos. Nossos resultados demonstraram que a infecção por *T.gondii* induz uma secreção significativamente maior de uréia em macrófagos WT peritoneais quando comparados aos macrófagos WT de medula. Os macrófagos WT peritoneais controles (não infectados) também apresentaram uma produção significativamente maior de ureia quando comparados aos macrófagos WT de medula controle (não infectados). Quando avaliamos a produção de ureia entre grupos com o mesmo tipo de macrófagos, macrófagos WT peritoneais infectados apresenta uma produção significativamente maior do que macrófagos WT peritoneais controle (não infectados). Macrófagos WT de medula infectados também apresentam uma produção significativamente maior do que macrófagos WT de medula controle (não infectados) (**Figura 7A**).

A infecção por *T.gondii* induz uma secreção significativamente maior de NO em macrófagos WT peritoneais quando comparados aos macrófagos WT de medula. Os macrófagos WT peritoneais controles (não infectados) apresentaram produção NO assim como os macrófagos WT de medula controle (não infectados), porém não com diferenças significativas entre eles. Quando avaliamos a produção de NO entre grupos com o mesmo tipo de macrófagos, macrófagos WT peritoneais infectados apresenta uma produção significativamente maior do que macrófagos WT peritoneais controle (não infectados). Já os macrófagos WT de medula infectados, apesar de apresentarem uma produção maior do que macrófagos WT de medula controle (não infectados), essa diferença não foi significativa (**Figura 7B**).

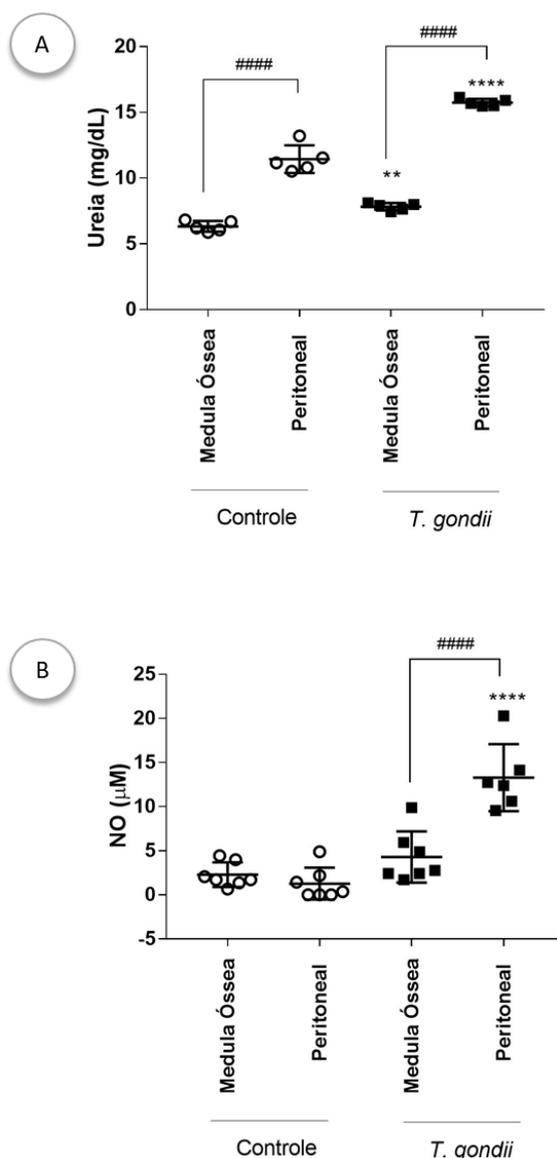


Figura 7: Quantificação de uréia e óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de macrófagos peritoneais e de medula. Macrófagos foram infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1, 5 parasitas/célula). Após 24h de infecção, os sobrenadantes dos macrófagos foram coletados e utilizados para quantificação de (A) uréia e (B) de NO. Dados representativos de um experimento realizado com 6 repetições e foram apresentados como média e EPM da quantidade de uréia (mg/dL) e NO (µM) secretados de um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. *Diferenças significativas entre macrófagos com mesma origem e em condições experimentais diferentes (* $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$). #Comparações entre macrófagos de origens distintas e em mesmas condições experimentais (# $P < 0,05$, ## $P < 0,001$ ### $P < 0,0001$). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.3 RESULTADOS PARTE II

Apartir dos resultados obtidos, selecionamos camundongos C57BL6 fêmeas e macrófagos de origem peritoneal para alcançarmos os objetivos seguintes.

5.3.1 Animais MIF^{-/-} recrutam mais macrófagos peritoneais do que animais WT

O número de macrófagos peritoneais recrutados por animal foi contado em camundongos WT e camundongos MIF^{-/-}. Nossos resultados demonstraram que camundongos MIF^{-/-} recrutaram significativamente mais macrófagos peritoneais em comparação com camundongos WT (P < 0,05). (Figura 8).

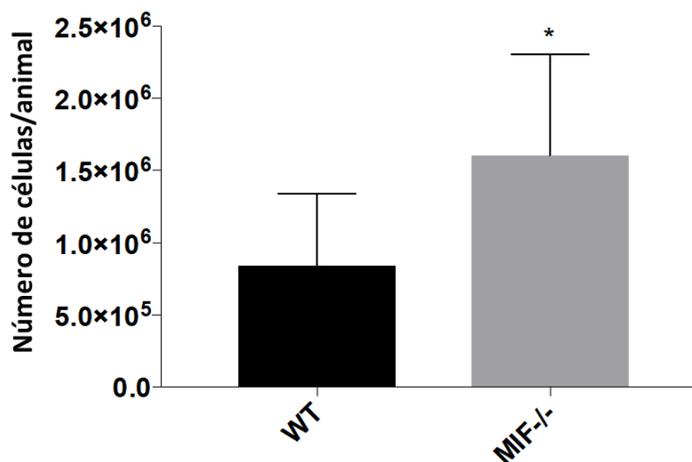


Figura 8: Avaliação do recrutamento de macrófagos peritoneais em camundongos WT e MIF^{-/-}. O número de células recrutadas foi expresso por cada grupo de animais. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. *Diferenças significativas entre macrófagos WT peritoneais e macrófagos WT derivados de medula óssea. (*P<0,05; **P<0,01; ****P< 0,0001). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.3.2 O inibidor 4-IPP reduziu a viabilidade dos macrófagos peritoneais tanto em camundongos WT quanto MIF^{-/-} apenas na concentração mais alta (50 μ M)

A viabilidade dos macrófagos peritoneais foi medida em camundongos WT e MIF^{-/-}. Macrófagos foram plaqueados em meio RPMI contendo o inibidor 4-IPP diluído em DMSO e o meio RPMI foi usado como controle. Diferentes concentrações de 4-IPP (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M) ou DMSO (0,14%) não alteraram a viabilidade significativamente em comparação ao controle, tanto em macrófagos WT quanto em macrófagos MIF^{-/-} (Fig.2A e B, respectivamente). No entanto, nossos resultados mostraram que macrófagos peritoneais de camundongos WT plaqueados com a concentração de 50 μ M do inibidor 4-IPP tiveram sua viabilidade significativamente reduzida em relação aos macrófagos plaqueados apenas com meio RPMI ($p < 0,0001$). Resultados semelhantes foram observados em macrófagos MIF^{-/-} (**Figura 9A e 9B**, respectivamente).

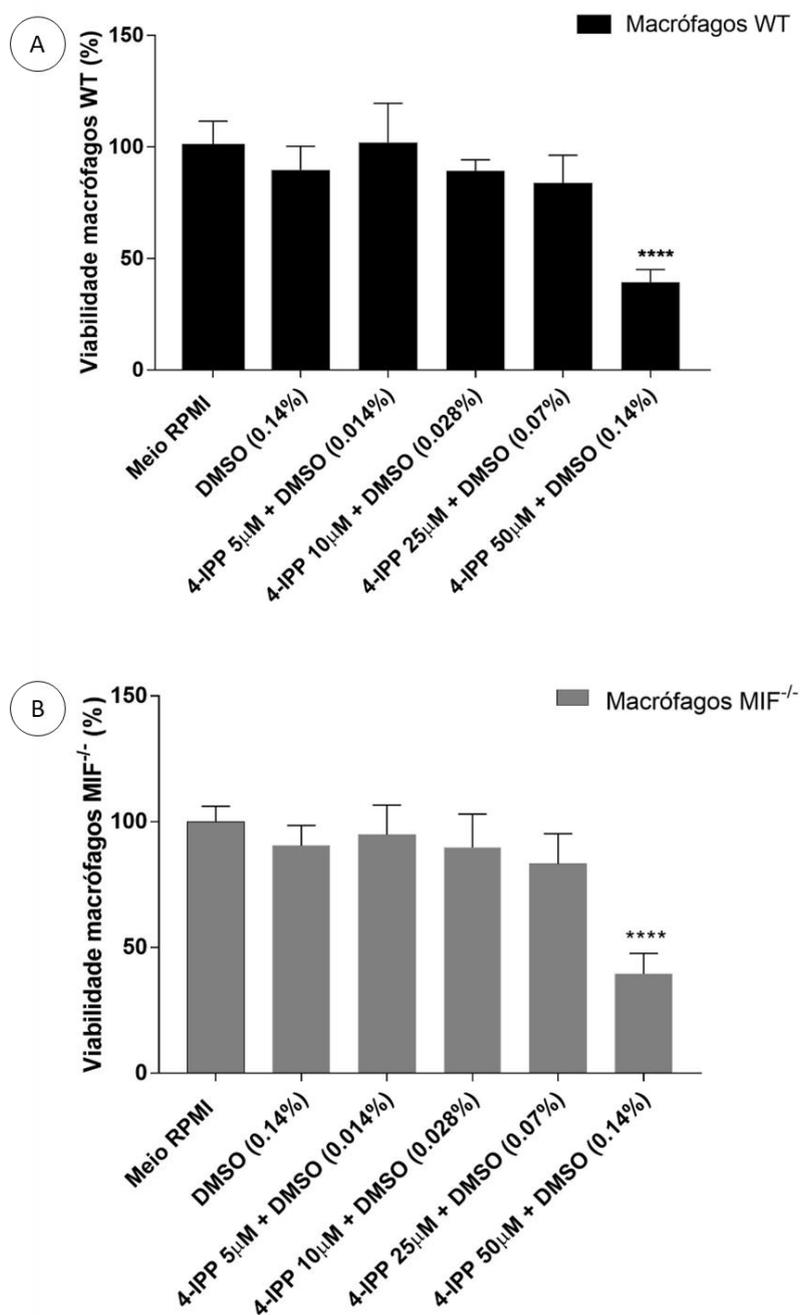


Figura 9: Viabilidade de macrófagos após tratamento com 4-IPP. Macrófagos C57BL/6 WT (A) MIF^{-/-} (B) foram plaqueados na placa de cultura de 96 poços e tratados com 5, 10, 25 e 50µM de 4-Iodo-6-fenilpirimidina (4-IPP) em meio RPMI. DMSO foi usado para solubilizar 4-IPP. Macrófagos controle WT e MIF^{-/-} não foram tratados (meio RPMI) ou tratados com 0,14% de DMSO. Os macrófagos foram incubados com 44µM de resazurina e foi lida a absorbância (570nm). Os dados foram apresentados em uma porcentagem de viabilidade com base em macrófagos não tratados que foram considerados como 100% de viabilidade. Dados representativos de um experimento realizado com 6 repetições usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. Os dados foram expressos como média e valores EPM. As comparações entre tratados e não tratados (Meio RPMI) foram realizadas usando One Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Sidak's (****P <0,0001).

5.3.3 A copresença de infecção por *Toxoplasma gondii*, do inibidor 4-IPP e a ausência de MIF endógeno modificam a produção de citocinas

O perfil de citocinas Th1, Th17 e Th2/Treg foi analisado para avaliar a influência da infecção por *T. gondii*, inibidor 4-IPP e ausência de MIF endógeno. Usamos diferentes concentrações de 4-IPP e macrófagos não tratados como controle, macrófagos não infectados e infectados por *T. gondii* e macrófagos MIF^{-/-} e WT. Quando a citocina MIF foi analisada em macrófagos WT, nossos resultados mostraram que os tratamentos com 4-IPP não alteraram significativamente a produção endógena de MIF em macrófagos não infectados (Fig. 8A). No entanto, macrófagos infectados com *T. gondii* e tratados com 4-IPP (5, 10 e 25µM) reduziram significativamente a produção de MIF em comparação com animais não tratados (**Figura 10A**).

Considerando as citocinas dos perfis Th2/Treg, apenas IL-10 foi detectada. A IL-10 não foi detectada em macrófagos não infectados de camundongos WT e MIF^{-/-}. No entanto, a infecção por *T. gondii* estimulou a produção de IL-10 nestas células. A produção de IL-10 em células MIF^{-/-} infectadas foi significativamente reduzida devido ao tratamento com 4-IPP (10 e 25µM). Por outro lado, o tratamento não alterou a produção de IL-10 em macrófagos WT infectados. Comparando macrófagos WT e MIF^{-/-}, detectamos maior produção de IL-10 em MIF^{-/-} em macrófagos infectados não tratados e tratados (5 e 25µM) em comparação com células WT (**Figura 10B**).

Analisando as citocinas Th1/Th17 em macrófagos WT e MIF^{-/-} detectamos citocinas TNF, IFN, IL-6 e IL-17. A produção de TNF foi estimulada pela infecção por *T. gondii*. Os tratamentos com 4-IPP (10 e 25 µM) causaram redução significativa na produção de TNF em macrófagos WT e MIF^{-/-} infectados. Macrófagos WT infectados têm concentrações significativamente mais altas de TNF em macrófagos não tratados e tratados com 4-IPP (5, 10 e 25µM) em comparação com células MIF^{-/-} infectadas (**Figura 10C**).

A infecção por *T.gondii* estimulou a secreção de IFN- γ em macrófagos. Os tratamentos com 4-IPP (10 e 25 μ M) reduziram significativamente a concentração de IFN- γ em macrófagos WT infectados. Os níveis de IFN- γ foram maiores em macrófagos WT infectados e não tratados em comparação com MIF^{-/-}, atingindo significância estatística (**Figura 10D**).

A secreção de IL-6 também foi estimulada pela infecção por *T.gondii*. Os tratamentos com 4-IPP (5, 10 e 25 μ M) diminuíram a secreção de IL-6 em ambos os macrófagos WT e MIF^{-/-} infectados. A comparação entre WT infectado e MIF^{-/-} infectado mostrou que as células WT produziram mais IL-6 do que MIF^{-/-} em macrófagos não tratados e tratados (5 e 25 μ M) (**Figura 10E**).

Finalmente, IL-17 também foi secretada em resposta à infecção por *T.gondii* em macrófagos WT e MIF^{-/-}. Em macrófagos WT infectados, os tratamentos com 4-IPP (10 e 25 μ M) causaram uma diminuição significativa da secreção de IL-17 em comparação com os não tratados. Macrófagos WT não tratados infectados produziram concentrações significativamente mais altas de IL-17 em comparação com MIF^{-/-} (**Figura 10F**).

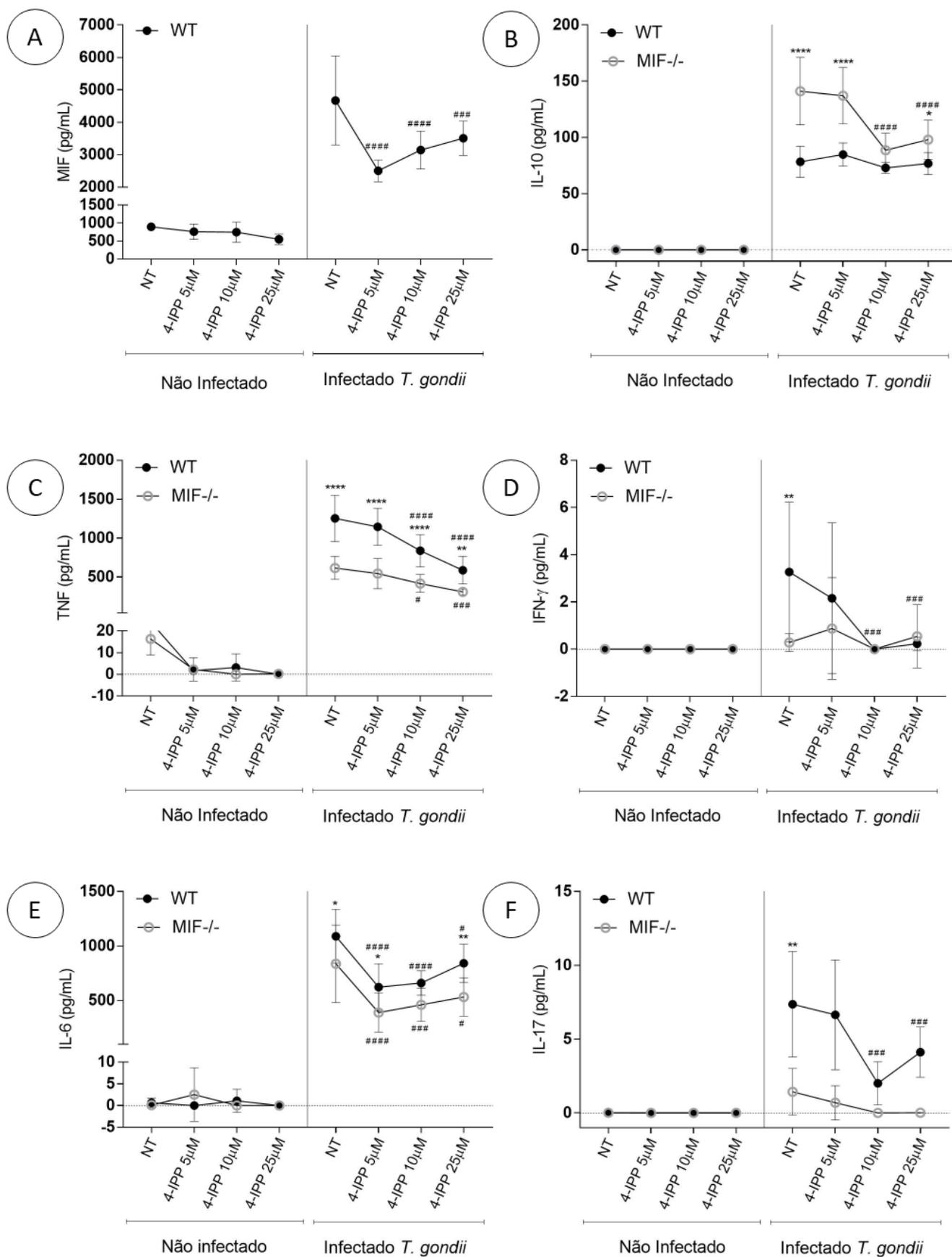


Figura 10: ELISA e quantificação de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* - CBA) para quantificar citocinas em sobrenadantes de macrófagos de C57BL/6 MIF^{-/-} e WT. Os macrófagos foram tratados ou não com 4-IPP (5, 10, 25 μM). Em seguida, as células foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) e incubadas por 24h. Foram coletados sobrenadantes de macrófagos e usados para quantificação de citocinas. Dados representativos de um experimento realizado com 6 repetições e foram apresentados em média e EPM da quantidade de citocinas (pg/mL) secretadas de um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. (A) MIF, (B) IL-10, (C) TNF, (D) IFN-γ (E) IL-6, (F) IL-17. *Diferenças significativas entre camundongos MIF^{-/-} e WT na mesma condição experimental (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,0001). #Comparações entre macrófagos tratados e não tratados dentro do mesmo grupo (#P<0,05, ### P<0,0001). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's. IL-10, TNF, IFN-γ, IL-6 e IL-17 foram medidos por CBA, enquanto MIF foi medido por ELISA.

5.3.4 Níveis mais altos de nitrito foram detectados em macrófagos WT

A fim de avaliar o perfil de ativação em macrófagos, os níveis de ureia e óxido nítrico foram mensurados em sobrenadantes de macrófagos. Nossos resultados demonstraram que a infecção por *T.gondii* induz a secreção de uréia em macrófagos WT e MIF^{-/-}. As células MIF^{-/-} não infectadas e tratadas com 4-IPP (5 e 25μM) têm um aumento significativo na secreção de ureia em comparação com as células não tratadas. Além disso, os tratamentos com 4-IPP, 5 e 25μM, causaram um aumento na secreção de uréia em macrófagos infectados tanto MIF^{-/-} quanto WT. Além disso, macrófagos MIF^{-/-} infectados e tratados com 4-IPP (5 μM) secretaram significativamente mais ureia do que células WT (**Figura 11A**).

A mensuração dos níveis de óxido nítrico revelou que a infecção por *T.gondii* desencadeia a secreção de NO em macrófagos WT e MIF^{-/-}. Além disso, os tratamentos com 4-IPP (5, 10 e 25μM) causaram uma diminuição significativa na secreção de NO em macrófagos infectados de camundongos MIF^{-/-} e WT. Além disso, macrófagos infectados não tratados e tratados (5 μM) de camundongos WT secretaram mais NO do que macrófagos de camundongos MIF^{-/-} (**Figura 11B**).

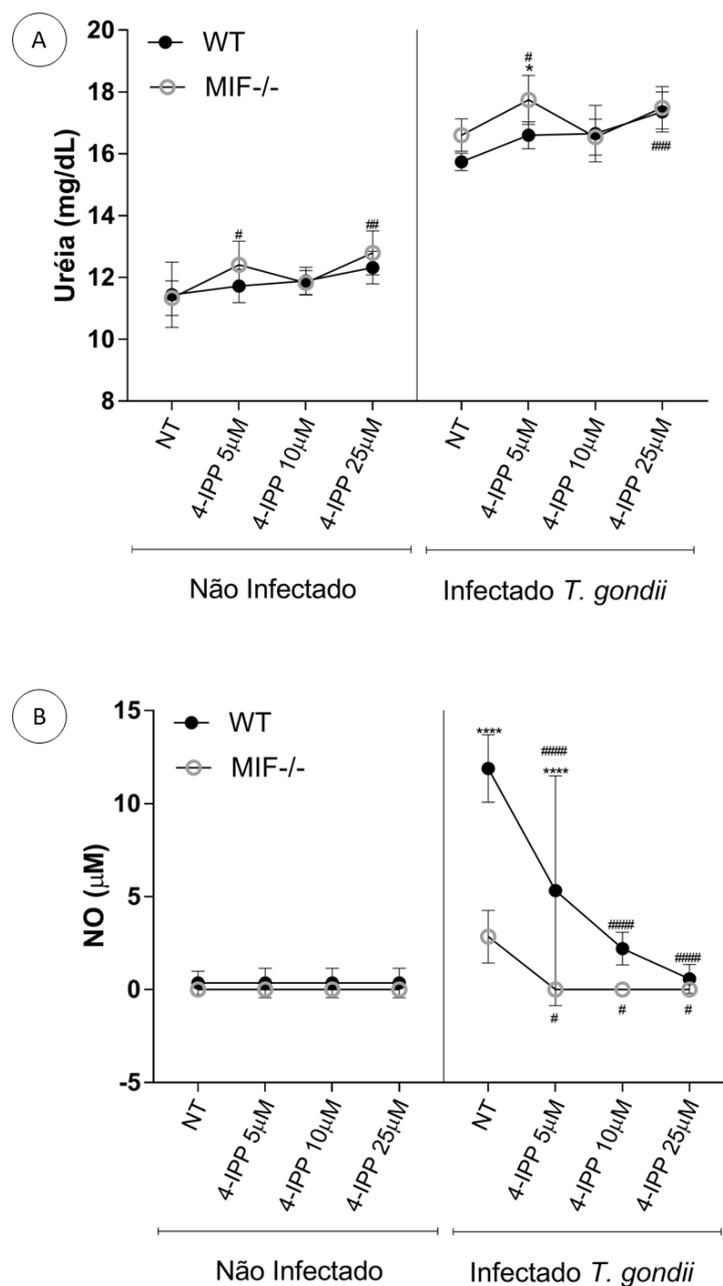


Figura 11: Quantificação de uréia e óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de macrófagos MIF^{-/-} e WT. Macrófagos foram tratados ou não com 4-IPP (5, 10, 25 µM) e infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1, 5 parasitas/célula). Após 24h de infecção, os sobrenadantes dos macrófagos foram coletados e utilizados para quantificação (A) uréia e (B) de NO. Dados representativos de um experimento realizado com 6 repetições e foram apresentados como média e EPM da quantidade de uréia (mg/dL) e NO (µM) secretados de um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. *Diferenças significativas entre camundongos MIF^{-/-} e WT na mesma condição experimental (*P<0,05; ***P<0,0001). #Comparações entre macrófagos tratados e não tratados dentro do mesmo grupo (#P<0,05, ###P<0,001####P<0,0001). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.3.5 A visão panorâmica dos mediadores secretados demonstrou que o MIF endógeno e o inibidor 4-IPP modificam o fenótipo de macrófagos infectados por *T. Gondii*

Para criar uma visão panorâmica dos resultados, os mediadores secretados foram analisados com base na frequência de alta produção desses mediadores. Nossos dados mostraram que macrófagos WT não tratados e infectados produzem visivelmente mais citocinas do perfil Th1/Th17 (IL-6, IL-17, TNF, IFN- γ) do que MIF^{-/-} (**Figura 12**). Além disso, a IL-10 foi produzida com maior frequência nos MIF^{-/-}. Além disso, ambos os macrófagos WT e MIF^{-/-} produziram NO em alta frequência (**Figura 12A**). Os tratamentos com 4-IPP modificam o perfil de secreção em macrófagos infectados com WT e MIF^{-/-}. Os macrófagos tratados com 4-IPP (5 μ M) são maiores produtores de IL-17, TNF, IFN- γ e NO enquanto os macrófagos MIF^{-/-} são maiores produtores de mediadores Th2: IL-10 e uréia (**Figura 12B**). O aumento da concentração de 4-IPP (10 μ M) causou uma redução na quantidade de mediadores que são produzidos em alta frequência pelos macrófagos WT. Foi possível detectar que apenas IL-6, TNF e NO foram produzidos em alta frequência por macrófagos WT. Por outro lado, os macrófagos MIF^{-/-} produzem apenas IL-10 em alta frequência nesta concentração de 4-IPP (**Figura 12C**). A maior concentração de 4-IPP (25 μ M) modifica o perfil de secreção de macrófagos. Os macrófagos WT tornaram-se grandes produtores de ureia, IL-6, IL-17 e TNF, enquanto o grupo MIF^{-/-} produziu IL-10 e ureia em alta frequência (**Figura 12D**).

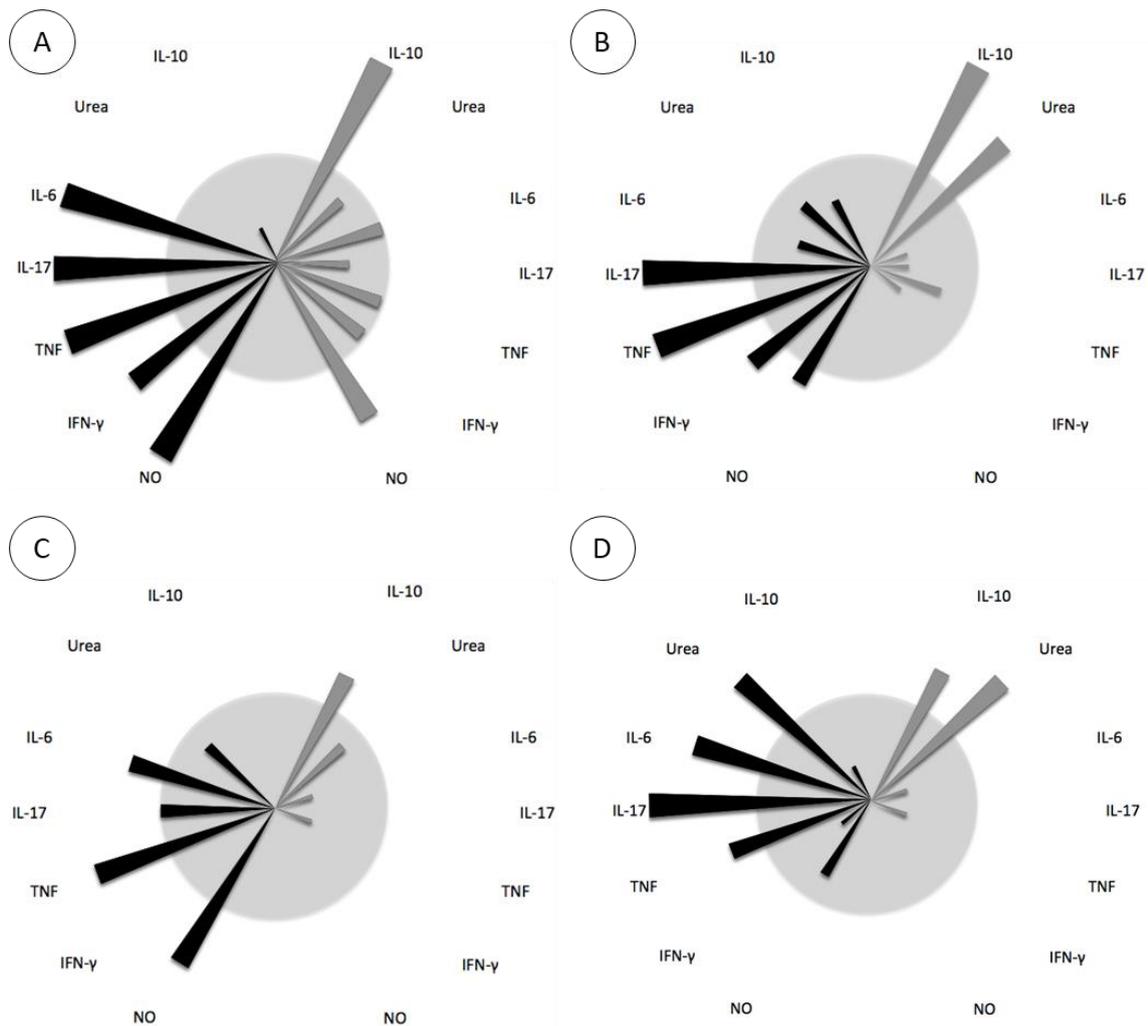


Figura 12: Gráficos de radar indicando a frequência de altos produtores dos mediadores secretados em macrófagos WT (radar preenchido de preto) e $MIF^{-/-}$ (radar preenchido de cinza) infectados por *T. gondii*. **(A)** Macrófagos não tratados; **(B)** macrófagos tratados com 4-IPP ($5\mu M$), **(C)** macrófagos tratados com 4-IPP ($10\mu M$); **(D)** macrófagos tratados com 4-IPP ($25\mu M$). Foi calculada a mediana global para cada mediador secretado, com base no universo de dados (macrófagos WT e $MIF^{-/-}$ infectados de todos os grupos experimentais). A mediana global foi utilizada como ponto de corte para categorizar a amostra como “baixa” (valores abaixo da mediana) ou “alto” (valores acima da mediana) produtores dos mediadores solúveis. Os resultados foram apresentados como gráficos de radar resumindo a frequência de altos produtores de mediadores apresentados em porcentagem. A frequência de 50% é representada pelo círculo cinza interno.

5.3.6 Ausência de MIF endógeno e tratamento 4-IPP pode modificar a capacidade de proliferação de *Toxoplasma gondii* em macrófagos

A fim de avaliar a funcionalidade dos macrófagos, o ensaio de proliferação de *T. gondii* foi realizado em macrófagos WT e MIF^{-/-}. O ensaio de proliferação, analisado 24h após a infecção, mostrou que macrófagos MIF^{-/-} tratados com inibidor 4-IPP (5 e 10 μ M) apresentaram proliferação significativamente menor em relação aos não tratados. Além disso, os macrófagos WT tratados com 4-IPP (5 μ M) apresentaram uma diminuição significativa na proliferação em comparação com as células WT não tratadas. A comparação entre WT e MIF^{-/-} mostrou que os macrófagos MIF^{-/-} não tratados e tratados (25 μ M) apresentaram altos níveis de proliferação de *T. gondii* em comparação com os WT (Figura 13).

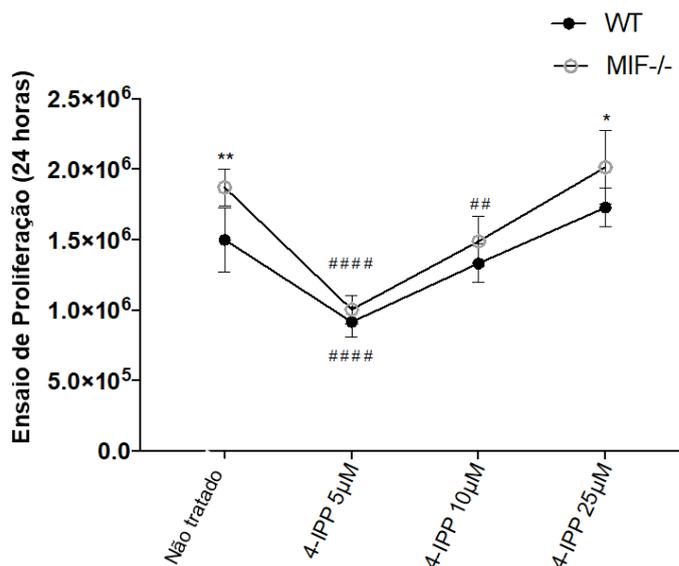
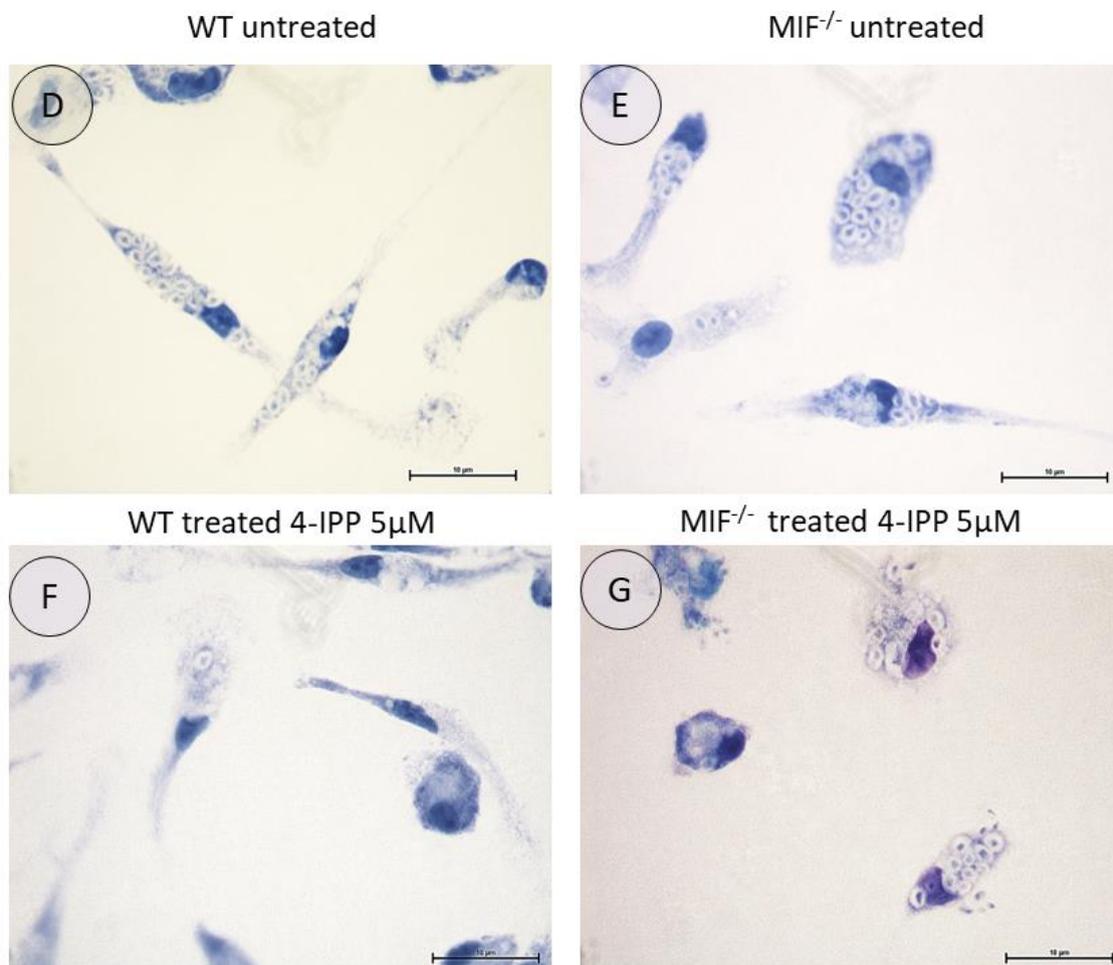
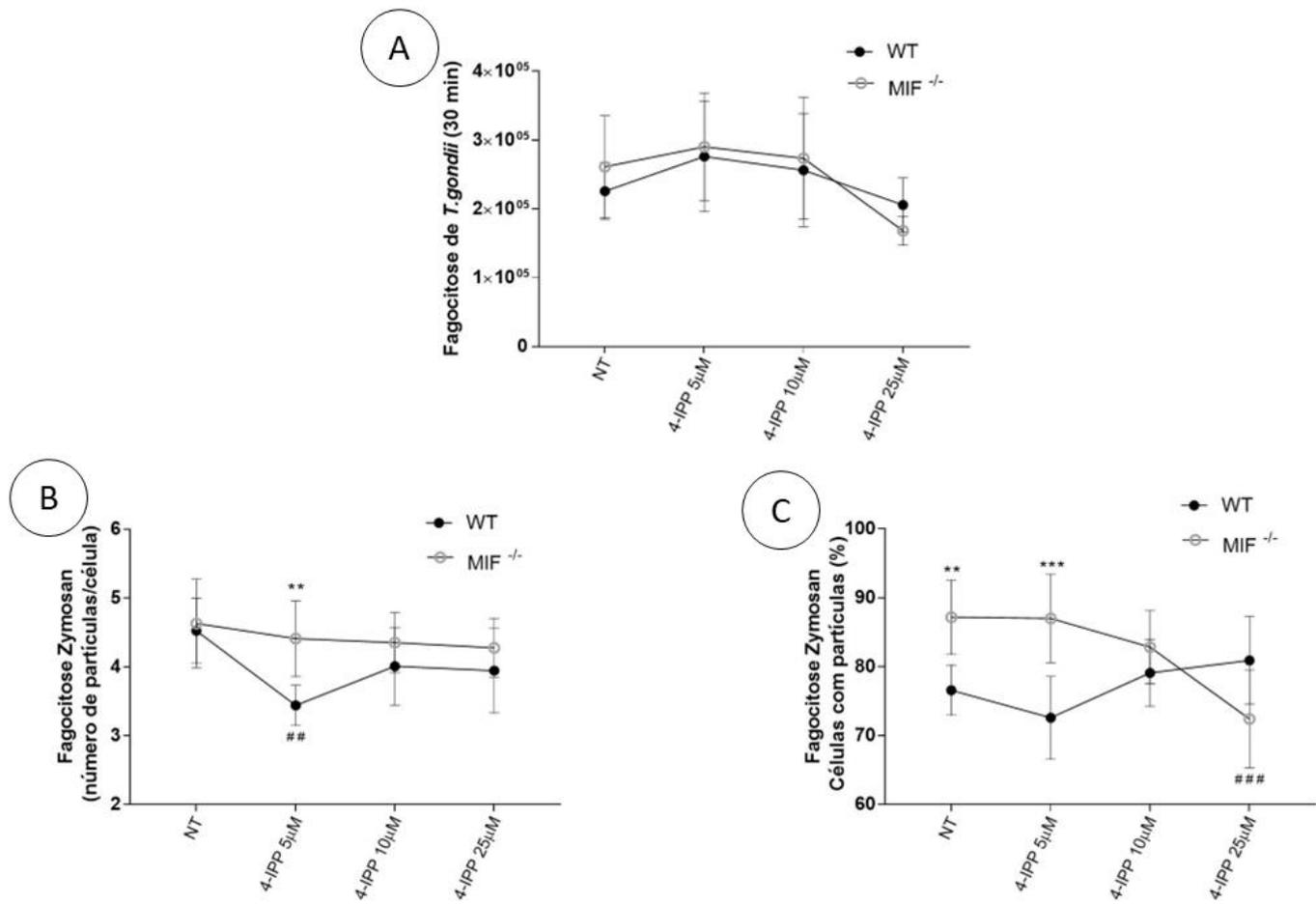


Figura 13: Proliferação de *Toxoplasma gondii* em macrófagos WT e MIF^{-/-}. Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços e depois tratados ou não com 4-IPP (5, 10, 25 μ M). Em seguida, os macrófagos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1, 5 parasitas/célula). Para o ensaio de proliferação de *T. gondii* (24h), as placas foram centrifugadas (250x g, 5 min, RT) para sedimentar os parasitas que eventualmente lisaram as células. Em seguida, os macrófagos infectados foram lisados usando tampão RIPA e os parasitas foram quantificados usando ensaio de β -galactosidase. O parasitismo foi expresso como o número de taquizoítos calculado com base em uma curva de referência de taquizoítos ($1,5 \times 10^4$ a 1×10^6).

Três experimentos independentes foram realizados em triplicata usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. *Diferenças significativas entre camundongos MIF^{-/-} e WT na mesma condição experimental (*P<0,05; **P<0,01). #Comparações entre macrófagos tratados e não tratados dentro do mesmo grupo (##P< 0,01, ####P< 0,0001). Os dados foram comparados pelo Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's.

5.3.7 Ausência de MIF endógeno e 4-IPP modificam a atividade de fagocitose

Além do exposto, para explorar mais sobre a função dos macrófagos, foi realizado o ensaio fagocítico. Os dados obtidos do ensaio de fagocitose de *T. gondii* não mostraram diferenças significativas entre os grupos (**Figura 14A**). Também foi realizado o ensaio de fagocitose de zimosan, e os resultados foram representados de acordo com o número de partículas encontradas no interior da célula ou porcentagem de macrófagos contendo partículas de zimosan. Os resultados obtidos mostraram que os macrófagos WT tratados (4-IPP 5µM) fagocitam significativamente menos partículas do que os não tratados. A comparação entre WT e MIF^{-/-} demonstrou que os macrófagos MIF^{-/-} tratados (5µM) apresentaram maiores capacidades fagocíticas do que os WT (**Figura 14B, 14D-G**). Além disso, uma porcentagem significativamente maior de células com partículas foi encontrada em macrófagos MIF^{-/-} não tratados e tratados (5 µM) em comparação com macrófagos WT. Por fim, os macrófagos MIF^{-/-} tratados com maior concentração do inibidor (4-IPP 25µM) apresentaram menos células com



partículas de zimosan do que as não tratadas (**Figura 14C, 14D-G**).

Figura 14: Ensaio de fagocitose de *T.gondii* e partículas de Zimosan em macrófagos WT e MIF^{-/-}. Para **(A)** ensaio de fagocitose de *T.gondii*, os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços e depois tratados ou não com 4-IPP (5, 10, 25 μM). Em seguida, os macrófagos foram incubados com taquizoítos de *T. gondii* previamente fixados (cepa RH, clone 2F1, 5 parasitas/célula). Para quantificar os taquizoítos fagocitados, os macrófagos foram lavados após 30 min para remover os taquizoítos não internalizados. Em seguida, os macrófagos foram lisados usando tampão RIPA e os parasitas foram quantificados usando ensaio de β-galactosidase. A fagocitose foi expressa como o número de taquizoítos calculado com base em uma curva de referência de taquizoítos previamente fixados ($1,5 \times 10^4$ a 1×10^6). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata usando um pool de macrófagos obtidos de 6 camundongos em cada grupo. Para o ensaio de fagocitose de partículas de zimosan, os macrófagos foram plaqueados em placas de 24 poços sob lamínulas redondas e depois tratados ou não com 4-IPP (5, 10, 25 μM). Em seguida, os macrófagos foram incubados com partículas de zimosan (5 partículas/célula). Após 30 min de incubação, as células foram fixadas e coradas com Giemsa para contagem. **(B)** Os dados foram expressos como número de partículas/célula fagocitadas com base na contagem de 200 células contendo partículas e **(C)** quantidade de células contendo partículas de zimosan, que foi quantificado em um total de 200 macrófagos. Três experiências independentes foram realizadas em triplicata. *Diferenças significativas entre camundongos MIF^{-/-} e WT na mesma condição experimental (**P<0,01; ***P<0,001). #Comparações entre macrófagos tratados e não tratados dentro do mesmo grupo (##P< 0,01, ###P< 0,001). Os dados foram comparados usando Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunnett's. Imagens de **(D)** macrófagos WT não tratados; **(E)** macrófagos MIF^{-/-} não tratados; **(F)** macrófagos WT tratados com 4-IPP (5 μM) e **(G)** macrófagos MIF^{-/-} tratados com 4-IPP (5 μM) foram capturadas utilizando um microscópio de luz Nikon Eclipse i90 acoplado a um sistema de captura de imagem. Ampliação original: 100x.

6. DISCUSSÃO

Os macrófagos são células heterogêneas os quais são distribuídos de forma ampla nos tecidos e caracterizados pela versatilidade de ações fisiopatológicas. A maioria dos estudos na área de imunologia dedicam-se em investigar o papel dos macrófagos na resposta imune inata e adaptativa com base no repertório de ativação dessas células. Algumas funções como a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios tem implicações ao desenvolvimento e progressão de inúmeras patologias (Barra, A.,2021).

Uma das principais funções desempenhada pelos macrófagos e que atuam como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores é a fagocitose. Nesse fenômeno, vários receptores são considerados fagocíticos por promover o englobamento e eliminação de partículas estranhas, debris celulares e células apoptóticas pelos macrófagos. O TLR4, embora não seja classificado como um receptor fagocítico, é capaz de aumentar a captura de partículas oriundas de patógenos, como o zimosan (Sigola et al., 2016). Assim, inúmeras moléculas secretadas por microorganismos são capazes de ativar a fagocitose atuando sobre determinados receptores presentes na membrana dos macrófagos (Rossol & Uribe-Querol, 2016).

Estudos apontam que macrófagos peritoneais residentes (F4/80^{high}) podem, dependendo da idade e do sexo, ser originados em parte por uma das subpopulações de macrófagos presentes no peritônio: small peritoneal macrophages (SPM) (Bain, 2016). Foi visto que em camundongos machos, parte dos macrófagos F4/80^{high} era dependente de origem hematopoiética e que esta fração aumentava com o aumento da idade. Sendo de 40% em camundongos de 3 semanas e chegando a 80% em camundongos de 16 semanas. Quando se compara a dependência de progenitores hematopoiéticos de macrófagos da subpopulação large macrophage peritoneal (LPM) em machos e fêmeas por quimerismo, é evidente que para uma mesma idade machos tem maior porcentagem de células derivadas de medula óssea. De fato, em fêmeas, mesmo com o passar da idade, o aumento não é muito grande, permanecendo baixo (Bain, 2016).

Os MΦ derivados da medula óssea e os MΦs peritoneais são as duas fontes mais convenientes para o isolamento de MΦs. Os MΦs da medula óssea são facilmente derivados a partir de precursores da medula óssea após 7 dias em cultura. Por outro lado, os MΦs peritoneais residentes, ou seja, provenientes de animais controles, são facilmente obtidos da cavidade peritoneal e purificados pela aderência em placas de cultura de plástico ou vidro. Além disso, a injeção de partículas de Bio-Gel de poliacrilamida, tioglicolato ou amido induz uma resposta inflamatória caracterizada pela presença precoce de neutrófilos, porém após 3-5 dias o peritônio se torna um microambiente com fácil isolamento de MΦs elicitados (CASSADO, 2011). Esses dados vão de encontro com os nossos resultados obtidos e da seleção de macrófagos peritoneais para subsequenciar os experimentos.

O MIF foi primeiramente descrito como uma citocina pró-inflamatória capaz de inibir a

migração randômica de macrófagos (BACHER et al., 1996; BLOOM; BENNETT, 1966). Ao longo dos últimos anos, pesquisas têm mostrado muitas outras funções para essa citocina, como papéis patológicos, fisiológicos e imunológicos (KANG; BUCLA, 2019; NISHIHARA, 2000). O presente estudo teve como objetivo revisar a primeira função descrita para MIF. Perguntamos se MIF e/ou homólogo de MIF auxiliam na regulação do destino e na função dos macrófagos, além de inibir a migração aleatória de macrófagos.

Foi proposto um melhor entendimento sobre os efeitos do MIF em macrófagos infectados por *T. gondii* usando o modelo MIF^{-/-}. Além disso, para compreender a função do homólogo de MIF neste sistema, foram realizados tratamentos com 4-IPP. O aumento do recrutamento de macrófagos observado em animais MIF^{-/-} em comparação com WT sugeriu que, na ausência de MIF, a migração randômica de macrófagos foi inibida, mantendo os macrófagos na cavidade peritoneal sob inflamação causada pelo tioglicolato estéril.

O inibidor 4-IPP pode se ligar de forma covalente e irreversível ao MIF sendo responsável por inibir seus efeitos biológicos (WINNER et al., 2008). O inibidor 4-IPP também exerce um efeito sobre D-DT, outra proteína da superfamília da tautomerase que é homóloga ao MIF. D-DT é uma citocina que pode se ligar ao receptor CD74 e promover em muitos casos os mesmos efeitos biológicos que o MIF (WINNER et al., 2008), sendo considerada uma citocina funcionalmente redundante. Estudos demonstraram que o D-DT pode compensar a inibição única de MIF (PASUPULETI et al., 2014). Dados anteriores mostraram que o 4-IPP também pode se ligar irreversivelmente ao D-DT, portanto, ambas as moléculas podem ser inibidas ao mesmo tempo (GUO et al., 2016).

No presente estudo, testamos quatro diferentes concentrações de 4-IPP para verificar a viabilidade de macrófagos, com base na concentração previamente descrita capaz de inibir a atividade de MIF tautomerase (WINNER et al., 2008). Nenhuma diferença significativa foi observada na viabilidade de macrófagos usando 5, 10 ou 25 µM de 4-IPP em comparação com o controle não tratado. No entanto, a maior concentração de 4-IPP (50µM) reduziu significativamente a viabilidade dos macrófagos e, portanto, esta concentração foi excluída dos próximos ensaios.

Nossos dados sobre a secreção de citocinas demonstraram que o MIF foi suprarregulado devido à infecção por *T. gondii* em macrófagos WT. MIF é uma citocina significativa para resolver a infecção por *T. gondii* (de Oliveira Gomes et al., 2011, Gomes et al, 2018). Ajuda a inibir a migração de macrófagos e levar o parasita à morte intracelular (BACHER et al., 1996; TAIT; HUNTER, 2009). O MIF também foi medido no sobrenadante de macrófagos tratados com 4-IPP. Macrófagos não infectados apresentaram níveis diminuídos de MIF detectáveis dependentes das concentrações de 4-IPP. Por outro lado, em macrófagos tratados infectados, a maior concentração de 4-IPP foi seguida por maiores medidas de MIF. Sabe-se que o 4-IPP se liga covalentemente e modifica a prolina catalítica do MIF, funcionando como substrato suicida e inibidor irreversível (WINNER et al., 2008). Assim, inferimos que o MIF inibido não pôde ser

detectado pelo ensaio ELISA. Portanto, este método foi utilizado para inferir a capacidade inibitória do 4-IPP, que mostrou sua melhor atividade em menor concentração, quando os macrófagos foram infectados.

Em seguida, as análises de citocinas foram realizadas comparando macrófagos de camundongos WT e MIF^{-/-}. Os dados mostraram alterações na produção de citocinas devido à ausência de MIF, presença de inibidor ou infecção por *T. gondii*. Detectamos que todas as citocinas analisadas (IL-10, TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17) foram reguladas positivamente em resposta à infecção por *T.gondii*. O equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias tem se mostrado essencial para controlar o parasitismo e prevenir uma resposta imune letal (GAZZINELLI et al, 1996). O aumento das citocinas inflamatórias ajuda a controlar a infecção por *T.gondii*, enquanto as citocinas reguladoras são cruciais para equilibrar a resposta imune.

Citocinas reguladoras, como a IL-10, são essenciais para modular a resposta imune à infecção por *T. gondii*. Camundongos com deficiência de IL-10 agudamente infectados com *T. gondii* perdem à resposta imune (GAZZINELLI et al, 1996). Estudos anteriores descobriram que a IL-10 pode inibir a síntese de MIF e diminuir a morte intracelular de *Leishmania donovani* por macrófagos humanos induzida por rMIF. Da mesma forma, a IL-10 inibe a produção de óxido nítrico e a atividade da óxido nítrico sintase por macrófagos murinos (WEISER et al., 1993).

Citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IFN- γ , regulam muitos aspectos da função dos macrófagos. O TNF é uma importante citocina TH1 envolvida na patogênese da toxoplasmose e na resolução de infecções (MEIRA et al., 2014). O IFN- γ tem um papel principal na inflamação e patogênese da toxoplasmose (LIESENFELD et al., 1999) e é crucial para induzir a morte microbiana e a ativação inflamatória por receptores Toll-like (TLRs) (SU et al., 2015).

O aumento dos níveis de IL-6 pode contribuir para o desenvolvimento do perfil Th17 e tem papel protetor na toxoplasmose precoce. Os camundongos IL-6^{-/-} têm inflamação e patologia graves em comparação com os IL-6^{+/+} (JEBBARI et al., 1998). A IL-17 foi relatada como uma citocina crucial na toxoplasmose, é responsável pela geração de uma resposta polimorfonuclear ótima contra o *T. gondii* e sua ausência parece estar associada à mortalidade e patologia (KELLY et al., 2005).

A comparação entre macrófagos de camundongos WT e MIF^{-/-} demonstrou que macrófagos MIF^{-/-} secretaram mais IL-10 em comparação com WT. Por outro lado, macrófagos de camundongos WT secretaram mais citocinas do perfil TH1/TH17, como TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17. Além disso, o 4-IPP diminuiu a produção de todas as citocinas analisadas em macrófagos WT e MIF^{-/-}.

Nossos resultados sugerem que MIF e homólogo de MIF são importantes para regular a secreção de citocinas em resposta à infecção. A ausência de MIF leva ao aumento da secreção de IL-10, mostrando possível regulação cruzada de MIF e IL-10 em macrófagos infectados por *T.gondii*. O MIF também demonstrou ser capaz de regular positivamente o TNF. Outros estudos relataram que o TNF regula positivamente a expressão de MIF renal em ratos com

glomerulonefrite (LAN et al., 1997). Juntos, esses dados sugerem uma regulação cruzada entre MIF e TNF. Resultados semelhantes foram observados para IFN- γ . Dados anteriores mostraram que MIF e IFN- γ são moléculas sinérgicas, sendo essenciais em muitos papéis pró-inflamatórios. O IFN- γ é essencial para induzir a síntese de TNF- α e óxido nítrico (NO); portanto, a ausência de MIF promove um efeito em cascata em muitas funções e componentes do sistema imunológico.

Nossos dados sobre IL-6 e IL-17 estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o MIF pode regular a IL-6 durante a infecção (CHUANG et al., 2010) e estimular a expressão e produção de IL-17 (STOJANOVIĆ et al., 2009), que por sua vez, pode estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias (DE LA PAZ SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2017).

A fim de compreender o papel de MIF/homólogo de MIF no fenótipo de macrófagos, uréia e NO foram mensurados em macrófagos WT e MIF^{-/-} tratados ou não com 4-IPP. Os macrófagos metabolizam a arginina em óxido nítrico ou ureia, dependendo das enzimas disponíveis. Os macrófagos M1 são caracterizados pela expressão da enzima óxido nítrico sintase, que metaboliza a arginina em NO e citrulina. Ao contrário, os macrófagos M2 expressam enzimas arginase, que hidrolisam a arginina em ornitina e ureia. A via utilizada para metabolizar a arginina limita sua disponibilidade para a outra via (RATH et al., 2014, YUNNA et al., 2020).

Pesquisas mostraram que a arginase é altamente expressa nos macrófagos pelas cepas clonais do tipo III (CEP) (JENSEN et al., 2011) e tipo I (RH) (JENSEN et al., 2011; ZHANG et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos em nosso trabalho em que macrófagos de camundongos infectados pela cepa RH, tanto WT quanto nocaute para MIF exibiram maiores níveis de uréia durante infecção.

Nossos dados demonstraram que tanto a uréia quanto o NO são secretados em resposta à infecção por *T.gondii* em ambos os macrófagos de camundongos WT e MIF^{-/-}. A secreção de uréia é ligeiramente maior em macrófagos MIF^{-/-}, especialmente na presença de baixas concentrações do inibidor 4-IPP. Por outro lado, o NO foi secretado em maior concentração em macrófagos WT e o inibidor de 4-IPP causou uma diminuição dose-dependente na secreção de NO em macrófagos WT e MIF^{-/-}. Esses dados sugerem que na ausência de MIF/homólogo de MIF os macrófagos têm maior capacidade de produzir uréia e demonstram que MIF e seu homólogo são importantes para induzir macrófagos a um perfil capaz de produzir preferencialmente NO.

O NO tem um papel essencial no controle da toxoplasmose e na redução da parasitemia. Além disso, o NO é responsável por desencadear a conversão entre as formas taquizoítas para bradizoítas (BOHNE; HEESEMANN; GROSS, 1994; IBRAHIM et al., 2009). MIF é responsável por realizar muitas funções em sinergismo com IFN- γ , incluindo ativar macrófagos murinos para expressar óxido nítrico sintase e produzir altos níveis de NO. Essa resposta de sinergismo é importante para amplificar a resposta pró-inflamatória e proteção contra infecção (CILLARI et al., 1994; MURRAY, 2011).

Para resumir nossos resultados e caracterizar o papel de MIF/homólogo de MIF em macrófagos infectados, gráficos de radar foram criados com base em todos os mediadores solúveis secretados em diferentes condições experimentais. Na presença de MIF/homólogo de MIF os macrófagos são altos produtores de uréia e todas as citocinas pró-inflamatórias analisadas, inversamente são baixos produtores de uréia e IL-10. Na ausência de MIF, os macrófagos são menores produtores de citocinas pró-inflamatórias e altos produtores de NO e IL-10.

O tratamento com 4-IPP foi adicionado para inibir MIF e homólogo de MIF em macrófagos WT e para inibir o homólogo de MIF em macrófagos MIF^{-/-}. O tratamento causou alterações importantes na secreção de citocinas reduzindo a secreção pró-inflamatória em macrófagos WT. Além disso, os macrófagos MIF^{-/-} tratados foram mantidos como altos produtores de IL-10 e se tornaram altos produtores de uréia e baixos produtores de NO. Juntos, esses resultados sugerem que MIF e homólogo de MIF contribuem para mediar a secreção de mediadores pró-inflamatórios e polarizar macrófagos infectados por *T.gondii* para o perfil M1 e a ausência de MIF contribui para levar o macrófago a um perfil menos inflamatório, compartilhando características de um perfil M2 .

Muitos fatores podem interferir na polarização dos macrófagos e o perfil de citocinas é um ponto chave. Estudos apontam para o papel de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF na condução de macrófagos para um perfil M1 clássico (MURRAY et al., 2014). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a demonstrar que o MIF participa do destino de macrófagos infectados por *T.gondii*, embora o MIF tenha sido descrito pela primeira vez como uma citocina associada a macrófagos.

Finalmente, para analisar MIF sobre a funcionalidade de macrófagos investigamos a capacidade fagocitária dos macrófagos e também os processos de proliferação de *T.gondii* nestas células. Nossos dados demonstraram que a proliferação de *T.gondii* diminuiu devido a baixas concentrações de tratamentos com 4-IPP em macrófagos de ambos os grupos. Por outro lado, a proliferação foi mais intensa nos macrófagos MIF^{-/-} em comparação aos WT. Esses dados indicam que o MIF deve ser associado ao controle da infecção por *T.gondii* de forma dependente da concentração do inibidor, conforme sugerido anteriormente por Barbosa e colaboradores, (2014). Foi previamente demonstrado um maior parasitismo por *T.gondii* em MIF^{-/-}. Camundongos MIF^{-/-} prenhes infectados por *T. gondii* apresentaram maior infecção que WT (MARCON et al., 2020). A ausência de MIF modifica a produção de citocinas, reduz a morte intracelular e facilita a proliferação e invasão de *T.gondii* (FLORES et al., 2008).

Nossos ensaios de fagocitose mostraram que MIF^{-/-} apresentou capacidade fagocítica aumentada em comparação com WT. Esses resultados contrastam com dados anteriores que demonstraram que a secreção de MIF pode levar os macrófagos a aumentar a capacidade fagocítica de forma autócrina ou parácrina (ONODERA et al., 1997). No entanto, estudos anteriores demonstraram que a capacidade fagocítica foi aumentada em macrófagos M2 em comparação com M1 (JAGGI et al, 2020). Sugerimos que o aumento da fagocitose em

macrófagos MIF^{-/-} observado em nosso estudo foi associado ao perfil menos inflamatório observado neste grupo e suporta nossa hipótese de que na ausência de MIF os macrófagos compartilham características de um perfil M2.

7. CONCLUSÃO

Na conclusão do nosso trabalho, podemos inferir que na presença de MIF/homólogo de MIF (WT não tratado), os macrófagos secretaram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e NO e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias e uréia. Essas características eram compatíveis com o perfil de macrófagos M1 (**Figura 15A**). Na ausência de MIF (MIF^{-/-} não tratados) o perfil pró-inflamatório foi equilibrado pelo aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e uréia. Os macrófagos aumentaram sua capacidade fagocítica e a proliferação de *T. gondii* sendo compatível com o perfil M2 (**Figura 15B**). Baixo nível de 4-IPP (5μM) foi eficiente para inibir MIF endógeno. A inibição de MIF e homólogo de MIF (WT tratado) causou diminuição na secreção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o perfil anti-inflamatório foi aumentado em comparação com WT não tratado. A proliferação e a fagocitose de *T. gondii* foram reduzidas nestas células (**Figura 15C**). A inibição do homólogo de MIF em macrófagos MIF^{-/-} (MIF^{-/-} tratado) causou redução drástica em citocinas pró-inflamatórias que é equilibrada por níveis aumentados de uréia e citocinas anti-inflamatórias. Esses macrófagos apresentaram características compatíveis com o perfil M2 e aumento da capacidade fagocítica (**Figura 15D**).

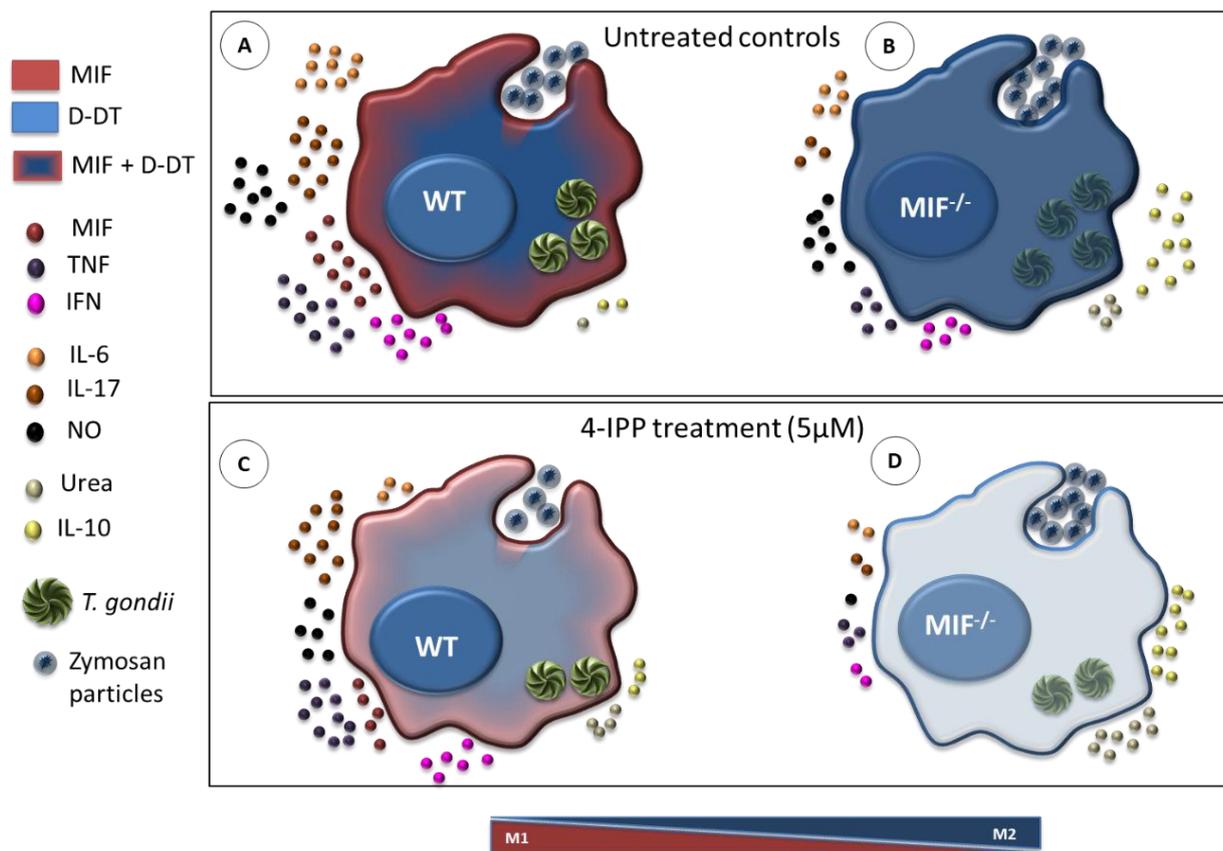


Figura 15: Modelo proposto para representar o papel do MIF na função e perfil de macrófagos em resposta à infecção por *T. gondii*. O esquema representa macrófagos peritoneais de fêmeas C57BL/6 (A) WT: presença de MIF (cor vermelha) e D-DT (homólogo de MIF) (cor azul); (B) MIF^{-/-}: ausência de MIF e presença de D-DT; (C) WT tratado com 4-IPP (5µM): inibição de MIF e D-DT; (D) MIF^{-/-} tratado com 4-IPP (5µM): ausência de MIF e inibição de D-DT. Macrófagos WT (A) apresentaram um perfil intenso de citocinas Th1/Th17 representadas pela secreção de MIF, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-17 e também NO enquanto IL-10 e uréia são secretados em pequenas quantidades. A ausência de MIF em macrófagos MIF^{-/-} causou uma redução significativa da secreção de citocinas Th1/Th17 enquanto a secreção de IL-10 e uréia aumentou significativamente. (C) O tratamento com 4-IPP em macrófagos WT inibe MIF e homólogo de MIF; a inibição causa uma ligeira diminuição na secreção de citocinas Th1/Th17 e aumento na secreção de IL-10 e ureia em comparação com macrófagos WT não tratados. Finalmente, (D) o tratamento com 4-IPP em macrófagos MIF^{-/-} inibe o homólogo de MIF em macrófagos sem MIF causando uma importante redução na secreção de citocinas Th1/Th17 e aumento significativo na secreção de IL-10 e uréia. A fagocitose e a proliferação de *T. gondii* foram aumentadas nos macrófagos MIF^{-/-} em comparação com os WT. O tratamento com 4-IPP causou uma redução significativa na proliferação de *T. gondii* em ambos os macrófagos WT e MIF^{-/-}. Finalmente, os macrófagos WT foram mais compatíveis com o perfil M1, enquanto os macrófagos MIF^{-/-} compartilharam características com o perfil M2.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJASEKARAN D, ZIEROW S, SYED M, BUCALA R, BHANDARI V, LOLIS EJ. Targeting distinct tautomerase sites of D-DT and MIF with a single molecule for inhibition of neutrophil lung recruitment. *Faseb j.* 2014; 28:4961–71. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256636> PMID: 25016026.

ATTIAS M, TEIXEIRA DE, BENCHIMOL M, VOMMARO RC, CREPALDI PH, DE SOUZA W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors.* 2020 Nov 23;13(1):588. doi: 10.1186/s13071-020-04445-z. PMID: 33228743; PMCID: PMC7686686.

BAIN WG, TRIPATHI A, MANDKE P, GANS JH, D'ALESSIO FR, SIDHAYE VK, AGGARWAL NR. Low-Dose Oxygen Enhances Macrophage-Derived Bacterial Clearance following Cigarette Smoke Exposure. *J Immunol Res.* 2016;2016:1280347. doi: 10.1155/2016/1280347. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27403445; PMCID: PMC4923598.

BARBOSA BF, PAULESU L, IETTA F, BECHI N, ROMAGNOLI R, GOMES AO, FAVORETO-JUNIOR S, SILVA DA, MINEO JR, MINEO TW, FERRO EA. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. *Placenta.* 2014 Mar;35(3):152-62. doi: 10.1016/j.placenta.2013.12.013. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24433846.

BARRA, A; O papel do Receptor Ativado por Protease (PAR)2 na resposta efetora de macrófagos murinos estimulados com LPS; 2021.

BAUGH JA, CHITNIS S, DONNELLY SC, MONTEIRO J, LIN X, PLANT BJ, WOLFE F, GREGERSEN PK, BUCALA R. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2002 May;3(3):170-6. doi: 10.1038/sj.gene.6363867. PMID: 12070782.

BECK, J. R. et al. A Novel Family of *Toxoplasma* IMC Proteins Displays a Hierarchical Organization and Functions in Coordinating Parasite Division. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 9, p. e1001094, 9 set. 2010.

BELLUCO S, SIMONATO G, MANCIN M, PIETROBELLI M, RICCI A. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(18):3085-3096. doi: 10.1080/10408398.2017.1352563. Epub 2017 Oct 11. PMID: 29020460.

BENOIT, M.; DESNUES, B. E MEGE, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infection. *The Journal of Immunology*, 181, pp. 3733-3739.

BORGES, M. et al. How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? *Parasite Immunology*, v. 41, n. 3, p. e12606, 19 dez. 2018.

BOZZA M, SATOSKAR AR, LIN G, LU B, HUMBLES AA, GERARD C, DAVID JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):341-6. doi: 10.1084/jem.189.2.341. PMID: 9892616; PMCID: PMC2192995.

BRONTE V, ZANOVELLO P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):641-54. doi: 10.1038/nri1668. PMID: 16056256.

CALANDRA T, BERNHAGEN J, METZ CN, SPIEGEL LA, BACHER M, DONNELLY T, CERAMI A, BUCALA R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995 Sep 7;377(6544):68-71. doi: 10.1038/377068a0. PMID: 7659164.

CALANDRA T, BERNHAGEN J, MITCHELL RA, BUCALA R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1994 Jun 1;179(6):1895-902. doi: 10.1084/jem.179.6.1895. PMID: 8195715; PMCID: PMC2191507.

CALANDRA T, ROGER T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):791-800. doi: 10.1038/nri1200. PMID: 14502271; PMCID: PMC7097468.

CALANDRA T, ROGER T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):791-800. doi: 10.1038/nri1200. PMID: 14502271; PMCID: PMC7097468.

CHSAVANEEYAKORN S, MOORE JM, OTHORO C, OTIENO J, CHAIYAROJ SC, SHI YP, NAHLEN BL, LAL AA, UDHAYAKUMAR V. Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1371-5. doi: 10.1086/344322. Epub 2002 Oct 3. PMID: 12402212.

CHUANG, CHIA-CHANG MD; HUNG, CHUNG-JYE MD; TSAI, MING-CHE MD; YEH, TRIA-MING PHD; CHUANG, YIN-CHING MD. High concentrations of circulating macrophage migration inhibitory factor in patients with severe blunt trauma: Is serum macrophage migration inhibitory factor concentration a valuable prognostic factor? *Critical Care Medicine*, v. 32, n. 3, p. 734–739, mar. 2004.

CHURCHILL, W.H., PIESSENS, W.F., SULIS, C.A. & J.R. DAVID (1975) Macrophage activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells. *Journal of Immunology* 115, 781.

DARD C, MARTY P, BRENIER-PINCHART MP, GARNAUD C, FRICKER-HIDALGO H, PELLOUX H, POMARES C. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Jun;16(6):447-460. doi: 10.1080/14787210.2018.1483721. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29855213.

DAVIES LC, JENKINS SJ, ALLEN JE, TAYLOR PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013; 14:986–995.

DE OLIVEIRA GOMES A, DE OLIVEIRA SILVA DA, SILVA NM, DE FREITAS BARBOSA B, FRANCO PS, ANGELONI MB, FERMINO ML, ROQUE-BARREIRA MC, BECHI N, PAULESU LR, DOS SANTOS MC, MINEO JR, FERRO EA. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. *Am J Pathol*. 2011 Jun;178(6):2792-801. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.005. PMID: 21641401; PMCID: PMC3124335.

DIVANGAHI M, KING IL, PERNET E. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2015; 36:307–314.

DUBEY JP, CHOUDHARY S, TILAHUN G, TIAO N, GEBREYES WA, ZOU X, SU C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. *Vet Parasitol*. 2013 Sep 1;196(1-2):206-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.015. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23411374.

DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Apr;11(2):267-99. doi: 10.1128/CMR.11.2.267. PMID: 9564564; PMCID: PMC106833.

DUPONT CD, CHRISTIAN DA, HUNTER CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* 2012 Nov;34(6):793-813. doi: 10.1007/s00281-012-0339-3. Epub 2012 Sep 7. PMID: 22955326; PMCID: PMC3498595.

FARIA, M. R. et al. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 8, n. 1, 4 ago. 2010.

FERRANTE, C. J., PINHAL-ENFIELD, G., ELSON, G., CRONSTEIN, B. N., HASKO, G., OUTRAM, S., et al. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to na M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation* 36 (4), 921–931. doi:10.1007/s10753-013-9621-3

FERRO E. A., MINEO J. R., IETTA F., BECHI N., ROMAGNOLI R., SILVA D. A., et al. (2008). Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. 172 50–58. 10.2353/ajpath.2008.070432

FLORES M, SAAVEDRA R, BAUTISTA R, VIEDMA R, TENORIO EP, LENG L, SÁNCHEZ Y, JUÁREZ I, SATOSKAR AA, SHENOY AS, TERRAZAS LI, BUCALA R, BARBI J, SATOSKAR AR, RODRIGUEZ-SOSA M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J.* 2008 Oct;22(10):3661-71. doi: 10.1096/fj.08-111666. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18606868; PMCID: PMC2537436.

FOROUTAN-RAD M, MAJIDIANI H, DALVAND S, DARYANI A, KOOTI W, SAKI J, HEDAYATI-RAD F, AHMADPOUR E. Toxoplasmosis in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfus Med Rev.* 2016 Jul;30(3):116-22. doi: 10.1016/j.tmr.2016.03.002. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27145927.

FRANCO. P. S., GOMES. A. O., BARBOSA. B. F., ANGELONI. M. B., SILVA. N. M., TEIXEIRA-CARVALHO. A. Azithromycin and spiramycin induce antiinflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. *Placenta*, v. 32, p. 44-838, 2011.

GABER T, SCHELLMANN S, EREKUL KB, FANGRADT M, TYKWINSKA K, HAHNE M, MASCHMEYER P, WAGEGG M, STAHN C, KOLAR P, DZIURLA R, LÖHNING M, BURMESTER GR, BUTTGEREIT F. Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible factor-1 alpha function and differentially influences human CD4+ T cell proliferation under hypoxia. *J Immunol.* 2011 Jan 15;186(2):764-74. doi: 10.4049/jimmunol.0903421. Epub 2010 Dec 17. PMID: 21169549.

GALVÁN-RAMÍREZ MDE L, DUEÑAS JIMÉNEZ JM, ROCÍO RODRÍGUEZ PÉREZ L, TROYO-SANROMAN R, RAMÍREZ-HERRERA M, GARCÍA-IGLESIAS T. Effect of nitaxozanide and pyrimethamine on astrocytes infected by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Arch Med Res.* 2013 Aug;44(6):415-21. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.07.002. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23973195.

GHAHREMANI PIRAGHAJ M, SOUDI S, GHANBARIAN H, BOLANDI Z, NAMAKI S, HASHEMI SM. Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function. *Life Sci.* 2018 Nov 1;212:203-212. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.052. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30287233.

GOMES AO, BARBOSA BF, FRANCO PS, RIBEIRO M, SILVA RJ, GOIS PSG, ALMEIDA KC, ANGELONI MB, CASTRO AS, GUIRELLI PM, CÂNDIDO JV, CHICA JEL, SILVA NM, MINEO TWP, MINEO JR, FERRO EAV. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Prevents Maternal Death, but Contributes to Poor Fetal Outcome During Congenital

- Toxoplasmosis. *Front Microbiol.* 2018 May 8;9:906. doi: 10.3389/fmicb.2018.00906. PMID: 29867817; PMCID: PMC5952001.
- GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978. PMID: 12511873.
- GORE Y, STARLETS D, MAHARSHAK N, BECKER-HERMAN S, KANEYUKI U, LENG L, BUCALA R, SHACHAR I. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J Biol Chem.* 2008 Feb 1;283(5):2784-92. doi: 10.1074/jbc.M703265200. Epub 2007 Dec 4. PMID: 18056708.
- HAMPTON MM. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Netw.* 2015;34(5):274-8. doi: 10.1891/0730-0832.34.5.274. PMID: 26802827.
- HESSE M, MODOLELL M, LA FLAMME AC, SCHITO M, FUENTES JM, CHEEVER AW, PEARCE EJ, WYNN TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6533-44. doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6533. PMID: 11714822.
- HONDA, A. et al. Interleukin-1 β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Journal of Dermatological Science*, v. 49, n. 1, p. 63–72, jan. 2008.
- HU, X. et al. Microglia/Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*, v. 43, n. 11, p. 3063–3070, nov. 2012.
- HUDSON JD, SHOAIABI MA, MAESTRO R, CARNERO A, HANNON GJ, BEACH DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med.* 1999 Nov 15;190(10):1375-82. doi: 10.1084/jem.190.10.1375. PMID: 10562313; PMCID: PMC2195698.
- IVANOVA, D. L.; MUNDHENKE, T. M.; GIGLEY, J. P. The IL-12– and IL-23–Dependent NK Cell Response Is Essential for Protective Immunity against Secondary *Toxoplasma gondii* Infection. *The Journal of Immunology*, 11 out. 2019.
- JENNES M, DE CRAEYE S, DEVRIENDT B, DIERICK K, DORNY P, COX E. Strain- and Dose-Dependent Reduction of *Toxoplasma gondii* Burden in Pigs Is Associated with Interferon-Gamma Production by CD8+ Lymphocytes in a Heterologous Challenge Model. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Jun 8;7:232. doi: 10.3389/fcimb.2017.00232. PMID: 28642841; PMCID: PMC5462990.
- JETTEN, N., VERBRUGGEN, S., GIJBELS, M. J., POST, M. J., DE WINTHER, M. P., AND DONNERS, M. M. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 17 (1), 109–118. doi:10.1007/s10456-013-9381-6
- JÜTTNER, S. et al. Migration Inhibitory Factor Induces Killing of *Leishmania major* by Macrophages: Dependence on Reactive Nitrogen Intermediates and Endogenous TNF- α . *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 5, p. 2383–2390, 1 set. 1998.
- KIMURA T, NADA S, TAKEGAHARA N, OKUNO T, NOJIMA S, KANG S, ITO D, MORIMOTO K, HOSOKAWA T, HAYAMA Y, MITSUI Y, SAKURAI N, SARASHINA-KIDA H, NISHIDE M, MAEDA Y, TAKAMATSU H, OKUZAKI D, YAMADA M, OKADA M, KUMANOGOH A. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. *Nat Commun.* 2016 Oct 12;7:13130. doi: 10.1038/ncomms13130. Erratum in: *Nat Commun.* 2017 Feb 27;8:14711. PMID: 27731330; PMCID: PMC5064021.

LEE, C. G., HOMER, R. J., ZHU, Z., LANONE, S., WANG, X., KOTELIANSKY, V., et al. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J. Exp. Med.* 194 (6), 809–821. doi:10.1084/jem.194.6.809

LUE H, DEWOR M, LENG L, BUCALA R, BERNHAGEN J. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. *Cell Signal.* 2011 Jan;23(1):135-44. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.013. Epub 2010 Aug 31. PMID: 20807568; PMCID: PMC3586206.

LUE H, KAPURNIOTU A, FINGERLE-ROWSON G, ROGER T, LENG L, THIELE M, CALANDRA T, BUCALA R, BERNHAGEN J. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal.* 2006 May;18(5):688-703. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.06.013. Epub 2005 Aug 24. PMID: 16122907.

LUE H, KLEEMANN R, CALANDRA T, ROGER T, BERNHAGEN J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* 2002 Apr;4(4):449-60. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01560-5. PMID: 11932196.

LUE H, THIELE M, FRANZ J, DAHL E, SPECKGENS S, LENG L, FINGERLE-ROWSON G, BUCALA R, LÜSCHER B, BERNHAGEN J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene.* 2007 Aug 2;26(35):5046-59. doi: 10.1038/sj.onc.1210318. Epub 2007 Feb 19. PMID: 17310986.

MAASER C, ECKMANN L, PAESOLD G, KIM HS, KAGNOFF MF. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2002 Mar;122(3):667-80. doi: 10.1053/gast.2002.31891. PMID: 11875000.

MARCON CF, FERREIRA PTM, FRANCO PS, RIBEIRO M, SILVA RJ, SOUSA RAP, OLIVEIRA CJF, JUNIOR VR, GOMES MLM, CHICA JEL, MINEO TWP, MINEO JR, BARBOSA BF, FERRO EAV, GOMES AO. WITHDRAWN: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and pregnancy may impact the balance of intestinal cytokines and the development of intestinal pathology caused by *Toxoplasma gondii* infection. *Cytokine X.* 2020 Jul 21;2(3):100034. doi: 10.1016/j.cyttox.2020.100034. Erratum in: *Cytokine X.* 2020 Sep 21;2(3):100040. PMID: 33604559; PMCID: PMC7885889.

MARTINEZ, F. O., SICA, A., MANTOVANI, A., AND LOCATI, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13, 453–461. doi:10.2741/2692

MERK, M. et al. The D -dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 34, 4 ago. 2011.

MERK, M. et al. The Golgi-Associated Protein p115 Mediates the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 11, p. 6896–6906, 19 maio 2009.

MITCHELL RA, LIAO H, CHESNEY J, FINGERLE-ROWSON G, BAUGH J, DAVID J, BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):345-50. doi: 10.1073/pnas.012511599. Epub 2001 Dec 26. PMID: 11756671; PMCID: PMC117563.

MITCHELL RA, METZ CN, PENG T, BUCALA R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory

factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):18100-6. doi: 10.1074/jbc.274.25.18100. PMID: 10364264.

MODELELL M, CORRALIZA IM, LINK F, SOLER G, EICHMANN K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995 Apr;25(4):1101-4. doi: 10.1002/eji.1830250436. PMID: 7537672.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):460. PMID: 19029990; PMCID: PMC2724991.

MOSSER, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73 (2), 209–212. doi:10.1189/jlb.0602325

MOSSER, D. M., AND EDWARDS, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (12), 958–969. doi:10.1038/nri2448

MUKHOPADHYAY D, ARRANZ-SOLÍS D, SAEIJ JPJ. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Oct 15;10:580425. doi: 10.3389/fcimb.2020.580425. PMID: 33178630; PMCID: PMC7593385.

MUKHOPADHYAY, S., PEISER, L., AND GORDON, S. (2004). Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN-gamma in vitro: Distinct roles of class A scavenger and toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *J. Leukoc. Biol.* 76 (3), 577–584. doi:10.1189/jlb.0104014

MUNDER M, EICHMANN K, MORÁN JM, CENTENO F, SOLER G, MODELELL M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3771-7. PMID: 10490974.

MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, FISHER EA, GILROY DW, GOERDT S, GORDON S, HAMILTON JA, IVASHKIV LB, LAWRENCE T, LOCATI M, MANTOVANI A, MARTINEZ FO, MEGE JL, MOSSER DM, NATOLI G, SAEIJ JP, SCHULTZE JL, SHIREY KA, SICA A, SUTTLES J, UDALOVA I, VAN GINDERACHTER JA, VOGEL SN, WYNN TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008. PMID: 25035950; PMCID: PMC4123412.

NATHAN CF, KARNOVSKY ML, DAVID JR. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J Exp Med.* 1971 Jun 1;133(6):1356-76. doi: 10.1084/jem.133.6.1356. PMID: 5576335; PMCID: PMC2138934.

O'ROURKE, S. A., DUNNE, A., AND MONAGHAN, M. G. (2019). The role of macrophages in the infarcted myocardium: Orchestrators of ECM remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* 6, 101. doi:10.3389/fcvm.2019.00101

PAPPAS G, ROUSSOS N, FALAGAS ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009 Oct;39(12):1385-94. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003. Epub 2009 May 9. PMID: 19433092.

PASUPULETI V, DU W, GUPTA Y, YEH IJ, MONTANO M, MAGI-GALUZZI C, et al. Dysregulated D-dopachrome tautomerase, a hypoxia-inducible factor-dependent gene, cooperates with macrophage migration inhibitory factor in renal tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2014; 289:3713–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.500694> PMID: 24356968.

PEIXOTO, C. M. S.; LOPES, C. W. G. Patogenicidade para camundongos do *Toxoplasma gondii*/V(NICOLLE e MANCEAUX, 1909, Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolado de galinhas naturalmente infectadas. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Belo Horizonte, v.4, n.1, p.37-41, 1995.

PIXLEY, F. G. E STANLEY, E. R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. Trends Cells biology, 14, pp. 628-638.

POLLARD JW. Trophic macrophages in development and disease. Nat Rev Immunol. 2009 Apr;9(4):259-70. doi: 10.1038/nri2528. PMID: 19282852; PMCID: PMC3648866.

RANI S, PRADHAN AK. Evaluating uncertainty and variability associated with *Toxoplasma gondii* survival during cooking and low temperature storage of fresh cut meats. Int J Food Microbiol. 2021 Mar 2;341:109031. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109031. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33485138.

REYES JL, TERRAZAS LI, ESPINOZA B, CRUZ-ROBLES D, SOTO V, RIVERA-MONTOYA I, GÓMEZ-GARCÍA L, SNIDER H, SATOSKAR AR, RODRÍGUEZ-SOSA M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun. 2006 Jun;74(6):3170-9. doi: 10.1128/IAI.01648-05. PMID: 16714544; PMCID: PMC1479264.

ROGER T, DAVID J, GLAUSER MP, CALANDRA T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. Nature. 2001 Dec 20-27;414(6866):920-4. doi: 10.1038/414920a. PMID: 11780066.

ROSSOL, MANUELA; HEINE, HOLGER; MEUSCH, UNDINE; QUANDT, DAGMAR; KLEIN, CARINA; SWEET, MATTHEW J.; HAUSCHILDT, SUNNA. LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. Critical Reviews™ In Immunology, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 379- 446, 2011. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20>.

SCHLÜTER D, DÄUBENER W, SCHARES G, GROß U, PLEYER U, LÜDER C. Animals are key to human toxoplasmosis. Int J Med Microbiol. 2014 Oct;304(7):917-29. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.002. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25240467.

SIBLEY LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Immunol Rev. 2011 Mar;240(1):72-91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x. PMID: 21349087; PMCID: PMC3697736.

SIBLEY LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Immunol Rev. 2011 Mar;240(1):72-91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x. PMID: 21349087; PMCID: PMC3697736.

SICA, A.; INVERNIZZI, P.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. Hepatology, v. 59, n. 5, p. 2034–2042, 1 abr. 2014.

SIERRA-FILARDI, E., VEGA, M. A., SANCHEZ-MATEOS, P., CORBI, A. L., AND PUIG-KROGER, A. (2010). Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. Immunobiology 215 (9-10), 788–795. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.020

SIGOLA, LYNETTE B.; FUENTES, ANA-LUCÍA; MILLIS, LEONARD M.; VAPENIK, JACQUELINE; MURIRA, ARMSTRONG. Effects of Toll-like receptor ligands on RAW 264.7 macrophage morphology and zymosan phagocytosis. Tissue And Cell, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 389-396, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2016.04.002>.

SOLDATI D, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2001 Oct;31(12):1293-302. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00257-0. PMID: 11566297.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MONTOVANI, A., et al. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major player of cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte biology*, 86, pp. 1065-1073.

SONG G, OUYANG G & BAO S 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1): 59-71

STEFATER JA, REN S, LANG RA, DUFFIELD JS. Metchnikoff's policemen: Macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol. Med*. 2011; 17: 743–752.

TAKAHASHI N, NISHIHIRA J, SATO Y, KONDO M, OGAWA H, OHSHIMA T, UNE Y, TODO S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*. 1998 Nov;4(11):707-14. PMID: 9932108; PMCID: PMC2230345.

TAYLOR, P.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M., et al. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, pp. 901-944.

TRIVEDI-PARMAR V, JORGENSEN WL. Advances and Insights for Small Molecule Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J Med Chem*. 2018; 61:8104–19. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00589> PMID: 29812929.

VIGANÒ P, CINTORINO M, SCHATZ F, LOCKWOOD CJ, ARCURI F. The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Semin Immunopathol*. 2007 Jun;29(2):135-50. doi: 10.1007/s00281-007-0074-3. PMID: 17621699.

WAEBER G, CALANDRA T, RODUIT R, HAEFLIGER JA, BONNY C, THOMPSON N, THORENS B, TEMLER E, MEINHARDT A, BACHER M, METZ CN, NICOD P, BUCALA R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4782-7. doi: 10.1073/pnas.94.9.4782. PMID: 9114069; PMCID: PMC20802.

WEBSTER, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. *Parasites & Vectors*, v. 3, n. 1, p. 112, 2010.

WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013; 496: 445–455.

ZELLFORSCH, Z.; JESSEN, H. E MOE, H. (2012). The Fine Structure of Macrophages in the Enamel Organ, with Special Reference to the Microtubular System. 126, pp. 188- 466.

ZHANG N, WANG S, WANG D, LI C, ZHANG Z, YAO Z, LI T, XIE Q, LIU S, ZHANG H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and risk factors in domestic sheep in Henan province, central China. *Parasite*. 2016;23:53. doi: 10.1051/parasite/2016064. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27882868; PMCID: PMC5134671.

ZHANG X, MOSSER DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):161-78. doi: 10.1002/path.2284. PMID: 18161744; PMCID: PMC2724989.

GÓMEZ, A. S., QUARANTA, A. M., PIROTA, M. F., & QUARANTA, D.T. R. (2007). TOXOPLASMOSIS: SUS FORMAS CLINICAS. 5

LOPES, C. C. H., & BERTO, B. P. (2012). Aspectos associados à toxoplasmose: Uma referência aos principais surtos no Brasil. *Saúde & Ambiente em Revista*, 7(2), Art. 2

SIBLEY, L. D., MORDUE, D., & HOWE, D. K. (1999). Experimental Approaches to Understanding Virulence in Toxoplasmosis. *Immunobiology*, 201(2), 210–224. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(99\)80061-8](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(99)80061-8)

DEDICOAT, M., & LIVESLEY, N. (2006). Management of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected adults (with an emphasis on resource-poor settings). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005420.pub2>

CAMPINA, M. T., & QUEIROZ-FERNANDES, G. M. DE. (2018). Neurotoxoplasmose em pacientes imunocomprometidos e a relevância do diagnóstico por imagem. *Rev. Salusvita (Online)*, 421–435.

VALLADARES, B. T. N., SÁNCHEZ, M. A. L., ROJAS, M. B. I., & PADRÓN, L. S. (2020). Toxoplasmosis ocular: aspectos clínico-epidemiológicos en edad pediátrica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 24(4).

GÓMEZ-MARÍN, J. E. (2010). Toxoplasmose congênita em crianças sul-americanas: [Revisão]. *Sci. med.*
<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/5504/5064>

9. ANEXOS

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do papel de MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) na ativação de macrófagos de infectados por *Toxoplasma gondii*”, protocolo nº 020/18, sob a responsabilidade de **Eloisa Amália Vieira Ferro** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 27 de abril de 2018.

(We certify that the project entitled “Avaliação do papel de MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) na ativação de macrófagos de infectados por *Toxoplasma gondii*”, protocol 020/18, under the responsibility of Eloisa Amália Vieira Ferro - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of April 27th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 25/05/2018 Término: 25/05/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos isogênico e <i>Knockout</i>
Número de animais	70
Peso / Idade	20 Kg / 8-12 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia
Local onde será mantido o animal:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 05 de junho de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do papel de MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) na ativação de macrófagos de infectados por *Toxoplasma gondii*”, protocolo nº 020/18, sob a responsabilidade de **Eloisa Amália Vieira Ferro** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 28 de junho de 2019.

(We certify that the project entitled “Avaliação do papel de MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) na ativação de macrófagos de infectados por *Toxoplasma gondii*”, protocol 020/18, under the responsibility of Eloisa Amália Vieira Ferro - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 28th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 04/06/2018 Término: 31/12/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos isogênico/ Camundongos Knockout
Número de animais	70
Peso / Idade	20g / 8-12 semanas
Sexo	Fêmea
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU –REBIR-UFU
Local onde será mantido o animal:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU –REBIR-UFU

Alteração Realizada: Alteração da data término do projeto para 31/12/2020. Alteração do sexo dos animais de machos para fêmeas.

Uberlândia, 01 de julho de 2019.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019