

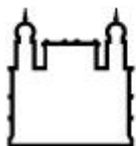
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**EFEITOS *in vitro* DE 3-BROMOPIRUVATO E ATOVAQUONA NA
INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS LLC-MK₂**

LOYZE PAOLA OLIVEIRA DE LIMA

Rio de Janeiro
Maio de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LOYZE PAOLA OLIVEIRA DE LIMA

**EFEITOS *in vitro* DE 3-BROMOPIRUVATO E ATOVAQUONA NA
INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS LLC-MK₂**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
Maio de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

L732 Lima, Loyze Paola Oliveira de

Efeitos *in vitro* de 3-bromopiruvato e atovaquona na infecção por *Toxoplasma gondii* em células LLC-MK2/ Loyze Paola Oliveira de Lima. - Rio de Janeiro, 2014.

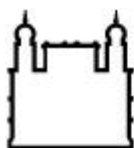
xvii, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 58-68

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Bromopiruvato. 3. Atovaquona. I. Título.

CDD 616.936



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LOYZE PAOLA OLIVEIRA DE LIMA

EFEITOS *in vitro* DE 3-BROMOPIRUVATO E ATOVAQUONA NA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS LLC-MK₂

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Helene Santos Barbosa

Aprovada em: 05/05/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Solange Lisboa de Castro	IOC - Fiocruz Presidente
Prof. Dr. Ana Carolina Stumbo	UERJ
Prof. Dr. Rossiane Claudia Vommaro	UFRJ
Prof. Dr. Laís de Carvalho (suplente)	UERJ
Prof. Dr. Daniel Adesse (revisor e suplente)	IOC-Fiocruz

Rio de Janeiro, 05 de maio de 2014

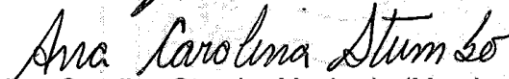



Ministério da Saúde

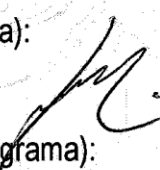
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa da dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular de **Loyze Paola Oliveira de Lima**, sob orientação de Dr^a Helene Santos Barbosa. Ao quinto dia do mês de maio de dois mil e quatorze, realizou-se às catorze horas, no Auditório Emmanuel Dias/Fiocruz, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"Efeitos *in vitro* de 3-Bromopiruvato e Atovaqona na infecção por *Toxoplasma gondii* em células LLC-MK2"** no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Biologia Celular e Molecular, na linha de pesquisa: Caracterização bioquímica, molecular, genética ou estrutural de agentes infecciosos e seus hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a Solange Lisboa de Castro – IOC/Fiocruz (presidente), Dr^a Ana Carolina Stumbo Machado – UERJ e Dr^a Rossiane Claudia Vommaro – UFRJ; e como suplentes: Dr^a Laís de Carvalho – UERJ e Dr. Daniel Adesse Pedra Martins - IOC/Fiocruz. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela **APROVAÇÃO** da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de **Mestra em Ciências** está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 05 de maio de 2014.


Dr^a Solange Lisboa de Castro (Presidente da Banca):


Dr^a Ana Carolina Stumbo Machado (Membro da Banca):


Dr^a Rossiane Claudia Vommaro (Membro da Banca):


Dr^a Leila de Mendonça Lima (Coordenação do Programa):

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as coisas que aconteceram no momento certo e na hora certa;

Aos meus pais, Maria Helena e Osmar, por todo o apoio, carinho, dedicação, por toda a confiança depositada em mim, por nunca me deixarem desistir, e mesmo nos momentos mais difíceis foram as pessoas que mais acreditaram em mim;

Aos meus queridos irmãos Lyza e Osmar Zarbini por todo apoio e por toda ajuda ao longo dos anos;

À minha amiga Amanda Hemerly por ser tão compreensiva comigo, por toda a ajuda nas traduções, por traçar planos comigo, por nunca deixar eu me abater por nada, e por todas as crises de riso que tive ao seu lado, os dias mais engraçados que tive até hoje foram na sua companhia. Muito obrigada por me ajudar a fundar uma escola com o nosso jeitinho, você sempre terá o meu afeto.

Ao meu amigo Pedro Rodrigues, por todos os almoços e experimentos ao seu lado, por confiar em mim em diversas situações, por sempre ser gentil com todo mundo, exceto comigo, me mostrando que a nossa amizade é tão forte que não precisamos de “sorrisinhos amarelos” para tornar o ambiente bom e feliz. Obrigada por ser meu melhor amigo, sem você minha vida não seria nada.

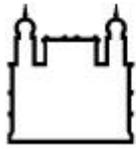
Aos meus tantos outros amigos que sempre me ajudaram direta ou indiretamente nessa caminhada, meu muito obrigada à Amandinha e Rafaelzinho por cuidarem tanto de mim, e ao meu querido amigo Victor Capella por sempre ter ficado ao meu lado me ajudando, e também me incentivando a reclamar menos sempre me dizendo que os problemas dele eram maiores que os meus;

Ao Prof. Dr. José Roberto Meyer Fernandes, do Laboratório de Bioquímica Celular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, pela ajuda nas medidas do consumo de oxigênio, e à Dra. Lisvane Paes Vieira por toda a paciência durante os experimentos, e por ter me ajudado muito;

Ao Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra por ter me iniciado no mundo científico, me ensinado as técnicas e me ajudado o quanto pudesse;

Aos alunos e profissionais dos laboratórios LBE (IOC-Fiocruz) e LTBM (UEZO) por auxiliarem de forma direta ou indireta;

À minha querida orientadora Prof. Dra. Helene Santos Barbosa por ter sempre buscado o melhor para mim, por ter me auxiliado tanto, e por ter feito dessa dissertação algo possível e muito melhor do que eu mesmo pudesse acreditar, agradeço também pela oportunidade, por todo o carinho e por sempre ter se preocupado comigo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

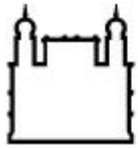
EFEITOS *in vitro* E DE 3-BROMOPIRUVATO E ATOVAQUONA NA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS LLC-MK₂

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Loyze Paola Oliveira de Lima

Toxoplasma gondii causa uma infecção comumente assintomática, porém pode se apresentar de forma grave durante a gravidez e em pacientes imunocomprometidos. A terapia atual para a toxoplasmose é restrita contra taquizoítos, e possuem pouco ou nenhum efeito sobre bradizoítos, que são mantidos em cistos teciduais como fonte recrudescente da infecção. Com isso, novas alternativas terapêuticas vêm sendo propostas, como o uso da Atovaquona, que apresentou alguma eficácia sobre taquizoítos e bradizoítos em cistos teciduais. Neste trabalho, foi estudado o efeito de 3-BrPA, um composto utilizado em testes sobre células cancerígenas, durante a interação de células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Quanto à célula hospedeira não se observou efeito do composto sobre a proliferação e viabilidade celular. A avaliação da interferência de 3-BrPA sobre o crescimento *in vitro* do *T. gondii* evidenciou uma redução na proliferação intracelular do parasito de cerca de 55% após 24 h de tratamento e 61% após 48 h. O desenvolvimento intracelular do parasito, analisado por MEV, apresentou características morfológicas comumente encontradas em cistos teciduais. A incubação das culturas com lectina DBA confirmou o desenvolvimento de cistos e por MET se evidenciou a presença de bradizoítos. Além disso, foram revelados parasitos degradados e a influência do composto sobre a endodiogenia. Outra abordagem adotada foi o tratamento de culturas infectadas com a combinação de 3-BrPA e Atovaquona, que resultou em uma redução de parasitos intracelulares de 73% após 24 h de tratamento e 71% após 48 h, em comparação ao controle, além da ausência da formação de parede cística nessas culturas. Conclui-se, portanto, que a utilização de 3-BrPA pode se apresentar como uma importante ferramenta para o estudo:(i) da cistogênese *in vitro*;(ii)do metabolismo do parasito, necessitando de maior aprofundamento do alvo de ação do composto em *T. gondii*;(iii) das vias metabólicas alternativas do parasito, e (iv) dos mecanismos moleculares/celulares desencadeados que levaram a morte dos parasitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT *in vitro* OF 3-BROMOPYRUVATE AND ATOVAQUONE ON INFECTION OF *Toxoplasma gondii* IN LLC-MK₂ CELLS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Loyze Paola Oliveira de Lima

Toxoplasma gondii usually causes an asymptomatic infection, but it can present severity during pregnancy and in immunocompromised patients. Current therapies for toxoplasmosis are restricted only against tachyzoites, and have little or no effect on bradyzoites, which are kept in tissue cysts like source of the infection recrudescence. Consequently, new therapeutic alternatives have been proposed, as the use of Atovaquone that showed some efficacy against tachyzoites and bradyzoites in tissue cysts. In this work, we propose to study the effect of 3-BrPA, a compound that is being tested against cancer cells, on the infection of LLC-MK₂ cells with tachyzoites of *T. gondii* (RH strain). No effect of 3-BrPA on host cell proliferation and viability was observed. Evaluation of 3-BrPA interference on *in vitro* growth of *T. gondii* showed a reduction in intracellular parasite proliferation about 55% after 24 h of treatment, and 61% after 48 h. Intracellular development of parasite, analyzed by SEM, showed morphological characteristics commonly found in tissue cysts. Incubation of cultures with DBA lectin confirmed the development of cysts and TEM showed the presence of bradyzoites. Moreover, we revealed the presence of degraded parasites and the influence of compound on endodyogeny. Another approach used was the treatment of infected cultures with combination of 3-BrPA and Atovaquone. This resulted in the reduction of intracellular parasites of 73% after 24 h of treatment and 71% after 48 h, compared to control, besides the absence of cyst wall formation in these cultures. Therefore, it is concluded that use of 3-BrPA may present as an important tool for study of: (i) *in vitro* cystogenesis, (ii) the metabolism of the parasite, requiring deeper understanding of the target of action of the compound in *T. gondii*, (iii) the alternatives metabolic pathways of the parasite, and (iv) the molecular / cellular triggered that led to death of the parasites mechanisms.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2 Formas infectivas	1
1.2.1 Taquizoíto	1
1.2.2 Bradizoíto	2
1.2.3 Esporozoíto	4
1.3 Ciclo de Vida	4
1.4 Principais características estruturais de <i>T. gondii</i>	7
1.4.1 Membrana trilaminar	7
1.4.2 Complexo apical e o citoesqueleto	7
1.4.3 Micronemas	8
1.4.4 Róptrias	8
1.4.5 Grânulos densos	9
1.4.6 Mitocôndria	9
1.4.7 Apicoplasto	10
1.4.8 Acidocalcissomo	10
1.5 Toxoplasmose	11
1.5.1 Toxoplasmose em humanos	11
1.5.2 Epidemiologia da toxoplasmose no Brasil	11
1.5.3 Tratamento da toxoplasmose	12
1.5.4 Atovaquona	13
1.6 3-Bromopiruvato	15
1.6.1 Efeito sobre células cancerígenas	15
1.6.2 Mecanismo de ação	16
1.6.3 Ação sobre micro-organismos	16

2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Diluição e preparação dos compostos	19
3.2 Cultura de células	19
3.3 Parasitos	19
3.4 Efeito de 3-BrPA na proliferação das células LLC-MK ₂	20
3.5 Avaliação do efeito dos compostos sobre a proliferação de <i>T. gondii</i> em células LLC-MK ₂	20
3.6 Análise do potencial inibitório dos compostos 3-BrPA e Atovaquona	21
3.7 Análise do potencial sinérgico do tratamento com a combinação de 3-BrPA e Atovaquona	21
3.8 Análise ultraestrutural do efeito de 3-BrPA sobre <i>T. gondii</i> em células LLC-MK ₂	21
3.9 Monitoramento da cistogênese <i>in vitro</i>	22
3.10 Análise da medida do consumo de oxigênio de <i>T. gondii</i>	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Efeito de 3-BrPA e Atovaquona na proliferação das células LLC-MK ₂	24
4.2 Efeito do composto 3-BrPA sobre a proliferação de <i>T. gondii</i> , cepa RH, durante a sua interação com células LLC-MK	24
4.3 Avaliação ultraestrutural por MEV do efeito de 3-BrPA sobre formas taquizoítos intracelulares em LLC-MK ₂	31
4.4 Avaliação ultraestrutural por MET do efeito de 3-BrPA sobre a interação de <i>T. gondii</i> em células LLC-MK ₂	31
4.5 Avaliação por fluorescência das estruturas	

semelhantes a cistos após tratamento com 3-BrPA	41
4.6 Efeito do composto Atovaquona sobre a proliferação de <i>T. gondii</i> , cepa RH, em células LLC-MK ₂	42
4.7 Efeito do composto 3-BrPA em associação com Atovaquona sobre a proliferação de <i>T. gondii</i> , cepa RH, em células LLC-MK ₂	46
4.8 Análise da presença de marcação para taquizoítos e cistos teciduais em culturas infectadas e tratadas com 3-BrPA em associação com Atovaquona	47
4.9 Análise da medida do consumo de oxigênio de <i>T. gondii</i>	49
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfologia geral da forma taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
Figura 1.2. Diferenças morfológicas entre taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos	3
Figura 1.3. Ciclo de vida <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura 1.4. Processo de endodiogenia	6
Figura 1.5. Detalhamento da região apical de <i>Toxoplasma gondii</i>	8
Figura 1.6 Estrutura do composto 3-BrPA	15
Figura 4.1 A-B. Efeito do tratamento de Atovaquona e 3-BrPA sobre células LLC-MK ₂ quanto a proliferação celular	24
Figura 4.2 A-B. Efeito do tratamento de variadas concentrações de 3-BrPA sobre o percentual de células LLC-MK ₂ infectadas com <i>T. gondii</i> (A), e sobre o número de parasitos intracelulares na proporção de infecção de 3:1 (B)	25
Figura 4.3 A-B. Análise do percentual de células infectadas e número de parasitos na interação de taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH e células LLC-MK ₂ na proporção 5:1	26
Figura 4.4 A-C. Análise por microscopia óptica de células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> após 24 h de infecção	27
Figura 4.5 A-C. Análise por microscopia óptica de células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> após 48 h de infecção	28
Figura 4.6 Interação de <i>T. gondii</i> da cepa RH em células LLC-MK ₂ na proporção 3:1 sob o tratamento com 10 µM de 3-BrPA após 6 dias de interação	29
Figura 4.7 A-C. Células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> observadas por microscopia óptica 6 dias pós infecção	30

Figura 4.8 A-C. Células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH vistos por MEV, após extração das membranas plasmática e vacúolo parasitóforo	33
Figura 4.9 A-C. Células infectadas e tratadas com 3-BrPA observadas por MEV com extração da membrana plasmática da célula hospedeira e do vacúolo parasitóforo	34
Figura 4.10 A-D. Células LLC-MK ₂ infectadas e mantidas por 6 dias e analisadas por MET	35
Figura 4.11 A-D. Análise por MET de culturas de células LLC-MK ₂ infectadas e mantidas por 6 dias sobre o tratamento com 10 µM 3-BrPA	36
Figura 4.12 A-D. Interação de <i>T. gondii</i> com células LLC-MK ₂ tratadas com 3-BrPA visualizadas por MET	37
Figura 4.13 A-C. Análise por MET de células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos e tratadas com 3-BrPA durante 6 dias	39
Figura 4.14 A-C. Visualização por MET de culturas de células LLC-MK ₂ infectadas e tratadas com 3-BrPA	40
Figura 4.15 A-F. Células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH incubadas com DBA-FITC	41
Figura 4.16: Quantificação dos vacúolos positivos com marcação positiva para DBA.	42
Figura 4.17: Interação de <i>T. gondii</i> da cepa RH em células LLC-MK ₂ na proporção 5:1 após tratamento com Atovaquona em diferentes concentrações após 24 e 48 h de interação	43
Figura 4.18A-B. Interação de <i>T. gondii</i> da cepa RH em células LLC-MK ₂ na proporção 5:1 observada por microscopia óptica	44
Figura 4.19 A-B. Cultura de LLC-MK ₂ durante a interação com <i>T. gondii</i> , após 48 h de infecção	45

Figura 4.20A-B. Interação de <i>T. gondii</i> da cepa RH em células LLC-MK2 na proporção 5:1 sobre as diferentes esquemáticas de tratamento	47
Figura 4.21A-D. Incubação com P-30 e DBA em células LLC-MK ₂ infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> , cepa RH, após 6 dias de infecção	48
Figura 4.22 :Consumo de oxigênio de taquizoítos provenientes de camundongos e células LLC-MK2 mantidas por 6 dias na presença ou ausência de 3-BrPA.	49

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 3-BrPA - 3-Bromopiruvato
- ADP - Adenosina difosfato
- ATP - Adenosina trifosfato
- DBA - *Dolichus biflorus* agglutinin
- DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium*
- DPI - Dia Pós-Infecção
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- FDA - *Food and drug administration*
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- MVP - Membrana do Vacúolo Parasitóforo
- PBS - Tampão fosfato salino
- RE - Retículo endoplasmático
- SFB - Soro fetal bovino
- VP - Vacúolo parasitóforo

INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório isolado de coelhos em 1908 por Splendore, no Brasil e no mesmo ano, pelos pesquisadores Nicolle e Manceaux (1908) do Instituto Pasteur na Tunísia que verificaram a presença do parasito nos roedores *Ctenodactylus gundi*. O nome do parasito, portanto, tem origem devido a sua descoberta neste roedor. Pertencente ao filo Apicomplexa, se caracteriza por ser uma célula polarizada e pelo seu formato em arco, sendo *Toxoplasma* (toxon = arco, plasma = forma), apresentando uma extremidade mais afilada na região anterior do corpo e a posterior arredondada. Tem como característica peculiar possuir um complexo apical na região anterior do corpo, composto pelo anel polar, anéis pré-conoidais, microtúbulos intraconoidais, conóide e pelas organelas secretórias, as róprias e os micronemas (revisto em Morrissette e Sibley, 2002; revisto em De Souza e cols., 2010). Como integrante do filo Apicomplexa, também apresenta uma camada pelicular tripla, formada pelo plasmalema intimamente associada ao complexo membranal interno (revisto em Soldati e Meissner, 2004). O *T. gondii* é ainda constituído, pelas estruturas básicas das células eucarióticas típicas e, algumas organelas específicas, como os grânulos densos, apicoplastos e acidocalcissomas (Fig. 1.1). Apresenta-se sob três formas infectivas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (revisto em De Souza e cols., 2010).

1.2 Formas infectivas

1.2.1 Taquizoíto

O taquizoíto de *T. gondii* mede aproximadamente 8 µm de comprimento e 2 µm de largura (Fig. 1.1 e 1.2). Apresenta como características morfológicas nenhum ou poucos grânulos de amilopectina e núcleo localizado na posição mediana do seu corpo, abaixo do apicoplasto e do complexo de Golgi. Após a invasão da célula hospedeira, o taquizoíto se estabelece e se desenvolve dentro de um vacúolo modificado no citoplasma da célula, denominado vacúolo parasitóforo, onde se multiplica de forma rápida e assexuada.

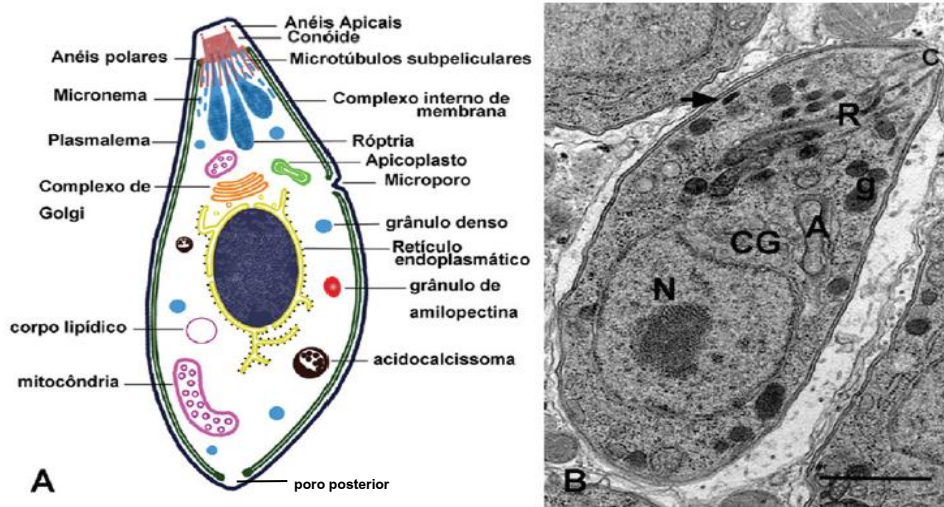


Figura 1.1. Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. (A) O esquema foi construído a partir de cortes aleatórios do parasito observados por microscopia eletrônica de transmissão. (B) Corte longitudinal do vacúolo parasitóforo onde são visualizadas várias estruturas representadas em (A): N - núcleo, c - conóide, R - róptrias, A - Apicoplasto, g - grânulo denso, CG - Complexo de Golgi, seta – micronema. Barra: 1 μm (retirado De Souza e cols., 2010).

1.2.2 Bradizoíta

O bradizoíta é morfologicamente muito similar ao taquizoíta, com algumas diferenças (Fig. 1.2). Este mede cerca de 7 x 1,5 μm , apresenta o núcleo deslocado para a região posterior do corpo do parasito, as róptrias são eletrondensas e os micronemas em um número maior, quando comparado com a forma taquizoíta (revisto em Dubey e cols., 1998; revisto em Weiss e Kim, 2000). Além disso, grânulos de amilopectina se encontram em grande quantidade no citoplasma dos bradizoítos (Coppin e cols., 2003; Guimarães e cols., 2003). Acredita-se que estes grânulos sirvam como reserva energética às formas que têm por característica permanecer viáveis por longos períodos, durante a fase crônica da infecção.

Além das características morfológicas, os bradizoítos permanecem no interior de cistos teciduais e multiplicam-se lentamente. Essa reprodução lenta representa uma forma evolutiva do ciclo, iniciada conforme o controle da infecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, resultando na formação de uma parede resistente, a parede cística, que confere ao cisto sua permanência silenciosa no hospedeiro por até mesmo anos (Kim e Weiss, 2011). Esses cistos são encontrados

em células dos sistemas nervoso, cardíaco e muscular, além de ser a forma de resistência no organismo (Cimerman e Cimerman, 1999). De acordo com a localização tecidual, apresenta forma variável, mas geralmente é redondo, medindo entre 20 e 200 μm (Dubey e cols., 1998). Acredita-se, que, fatores relacionados ao desenvolvimento da imunidade induzem a formação de cistos tissulares (Dubey e cols., 1998).

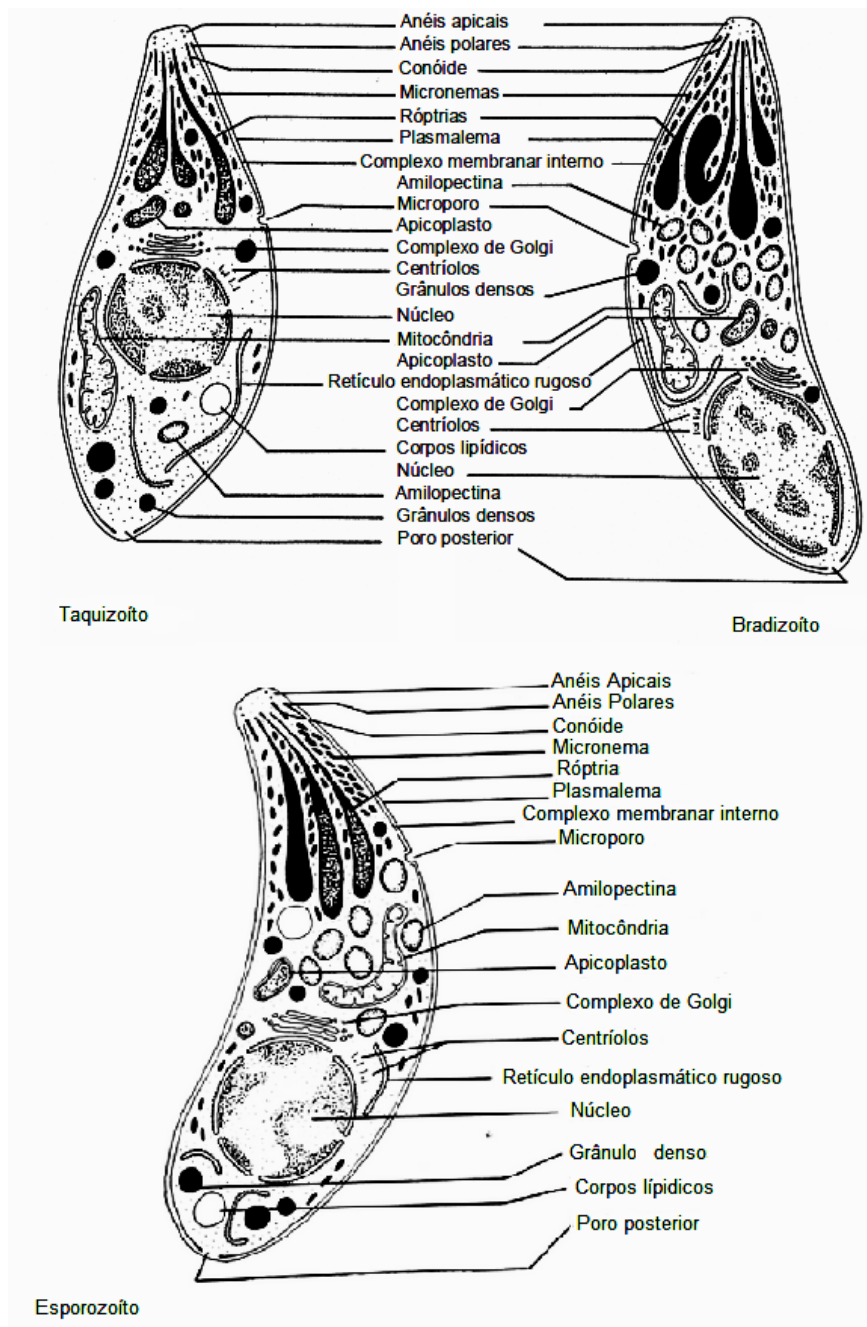


Figura 1.2. Diferenças morfológicas entre taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Reproduzido e adaptado de Dubey e cols., 1998)

1.2.3 Esporozoóito

Os esporozoítos possuem micronemas, róptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes do que bradizoítos e taquizoítos, e estão contidos em esporocistos no interior de oocistos esporulados. Os oocistos são liberados no ambiente juntamente com as fezes dos felinos e a esporulação ocorre após aproximadamente 1 à 5 dias dos oocistos estarem expostos ao ambiente. Os oocistos esporulados são sub-esféricos, medindo aproximadamente 13 x 9-11 µm, tem dois esporocistos cada um, e cada esporocisto contém quatro esporozoítos que medem 8 x 6 µm (Dubey e cols., 1998).

1.3 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteróxico, tendo como hospedeiros definitivos os membros da família *Felidae* e principal representante o gato, e como hospedeiros intermediários, os animais homeotermos, como aves e mamíferos, incluindo o homem (Fig. 1.3). Decorrente deste complexo ciclo de vida, os três estágios infecciosos: taquizoóito, bradizoóito e esporozoóito apresentam papéis biológicos distintos e alguns mecanismos de transmissão: (i) ingestão de oocistos esporulados na água e nos alimentos, resultantes do ciclo entero-epitelial do parasito em gatos; (ii) ingestão de cistos teciduais presentes em carne mal-cozida ou crua contaminadas (Tenter e cols., 2000); (iii) vertical através da infecção da mãe para o feto durante a gestação e, (iv) transfusão de sangue ou transplante de órgãos (Dubey e cols., 1998).

O ciclo sexuado inicia-se quando o hospedeiro definitivo ingere alimento contaminado com cistos teciduais ou oocistos esporulados pelo hospedeiro definitivo, o gato. Após a ingestão, a parede do cisto ou oocisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado do animal, liberando o parasito que poderá invadir as células epiteliais do intestino delgado, iniciando o desenvolvimento do *T. gondii*. Cinco tipos morfológicamente distintos do parasito se desenvolvem nas células epiteliais do intestino designados esquizontes dos tipos A à E. A esquizogonia compreende a merogonia (produção de merozoítos), gametogonia (produção de micro e macrogametas) e a esporogonia (produção de esporozoítos). Estes estágios diferenciados, por esquizogonia, irão produzir os merozoítos. Segue-se então, a gametogonia, com a formação dos macrogametas (gametas femininos) e

microgametas (gametas masculinos). O macrogameta permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas móveis sairão da célula e irão fecundar o macrogameta, formando o ovo ou zigoto. A esporogonia irá resultar na formação de oocistos imaturos que são eliminados juntamente com as fezes destes animais no ambiente e que irão maturar e se tornar infectivos (Frenkel e Dubey, 1972; Dubey e Frenkel 1973; Dubey, 2002; Hill e cols., 2005).

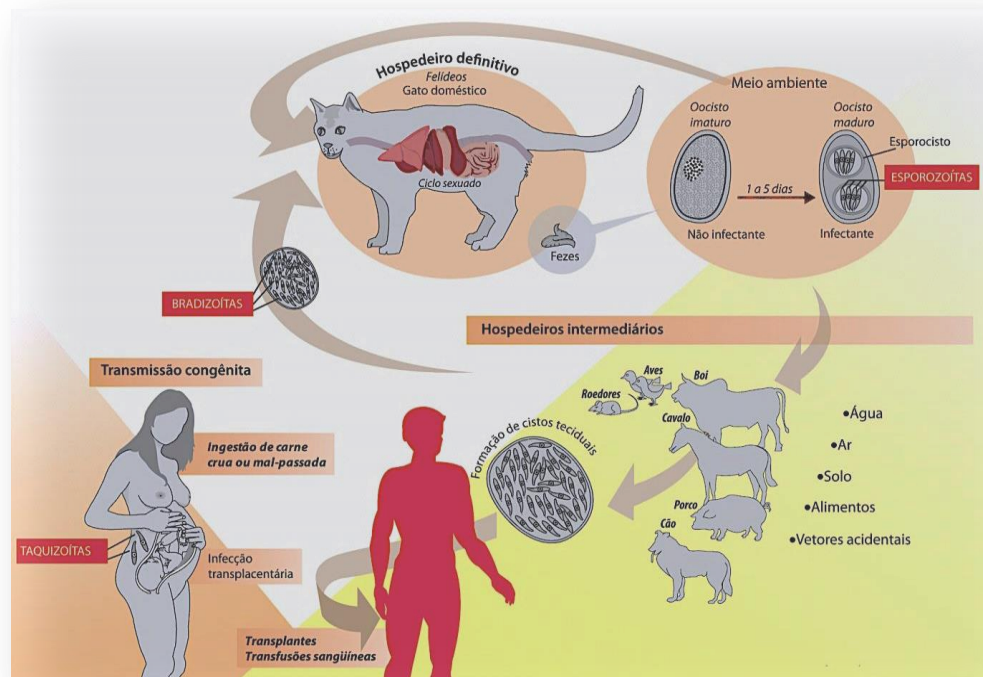


Figura 1.3. Ciclo de vida *Toxoplasma gondii* (retirado de Moura e cols., 2009)

A fase assexuada tem início quando hospedeiros intermediários ou definitivos ingerem oocistos e/ou cistos teciduais. Sob a ação das enzimas gástricas e intestinais rompe-se a parede cística ou oocística e os bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, são liberados. Esses parasitos invadem as células epiteliais intestinais do hospedeiro formando no citoplasma destas células vacúolos parasitóforos (VP) onde se diferenciam em taquizoítos. No interior destes VP, os taquizoítos se multiplicam rapidamente em um processo denominado endodiogenia, que consiste na formação de dois taquizoítos no interior de uma célula-mãe, que se degenera ao final do processo de divisão celular (Fig. 1.4). Esta multiplicação ocorre rapidamente formando estruturas denominadas rosáceas e prossegue até que haja o rompimento da célula e a liberação dos parasitos para, então, infectar novas

células (Dubey e cols., 1998). Com esse aumento no número de células infectadas, o parasito provoca um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade das formas infectantes adquiridas, cepa do parasito e da resistência do hospedeiro. Deste modo, taquizoítos são encontrados principalmente na fase aguda da doença, responsável, portanto, pelos danos patológicos.

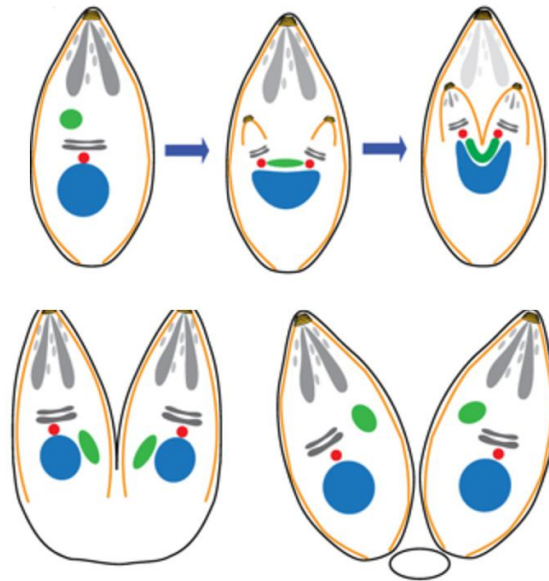


Figura 1.4. Processo de endodiogenia (retirado e modificado de Jacot e cols., 2013)

Após a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, a quantidade de parasitos extracelulares diminui no sangue, na linfa e nos órgãos viscerais, e há uma menor atividade da multiplicação intracelular. Os parasitos resistentes se diferenciam em bradizoítos e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) se modifica, formando os cistos teciduais, que auxiliam o parasito no escape do sistema imune do hospedeiro. Estes bradizoítos possuem como característica biológica, a multiplicação lenta podendo permanecer por longos períodos no interior dos cistos teciduais. Esta fase cística, juntamente com a diminuição da sintomatologia, caracteriza a fase crônica da toxoplasmose. Essa fase pode permanecer por longo tempo ou toda a vida do hospedeiro, e ser reativada devido a fatores envolvendo, por exemplo, a queda da imunidade (Smith e Parsons, 1996).

1.4 Principais características estruturais de *T. gondii*

1.4.1 Membrana trilaminar

O *T. gondii* é envolto por uma estrutura trimembranar formada pela membrana plasmática e pelo complexo interno de membranas (Dubey e cols., 1998; revisto em De Souza e cols., 2009). A membrana plasmática é contínua ao longo do corpo do parasito, e o complexo interno de membranas é um conjunto de cisternas achatadas, justaposto à membrana plasmática, interrompido em alguns pontos (conóide, microporo e poro posterior). Localizado na região mediana do corpo do parasito, o microporo é uma estrutura formada por uma invaginação da membrana plasmática e parece estar envolvido na ingestão de macromoléculas (Nichols e cols., 1994).

1.4.2 Complexo apical e o citoesqueleto

O complexo apical é o conjunto de estruturas localizadas na porção anterior do parasito envolvido na invasão ativa e sua sobrevivência dentro da célula hospedeira (Fig. 1.5). Deste complexo deriva o nome dado a este filo (Hu e cols., 2006). O complexo é composto pelo anel polar, pelos anéis pré-conoidais (1 e 2), pelos microtúbulos intraconoidais, pelo conóide e pelas organelas secretórias, róptrias e micronemas (Nish, 2008). Na parte apical do parasito, encontram-se dois anéis pré-conoidais e logo abaixo destes, o anel polar. Entre estas duas estruturas, localiza-se o conóide que possui forma cilíndrica cônica, formado por 14 fibras que se dispõem no sentido anti-horário, formando uma espiral (Fig. 1.5). Esta estrutura possui aproximadamente 280 nm de comprimento e 380 nm de diâmetro e tem a capacidade de se extruir durante a invasão da célula hospedeira, formando uma protrusão (Hu e cols., 2002). Dois microtúbulos de aproximadamente 350 nm de comprimento ficam localizados no interior do conóide, cuja função sugere-se que seja a de orientar as organelas secretórias para o pólo apical da célula, facilitando a exocitose de seus conteúdos (Nichols e Chiappino, 1987; Carruthers e Sibley, 1997; Hu e cols., 2002; Morrissette e Sibley, 2002). Partindo do anel polar, 22 microtúbulos subpeliculares cobrem 2/3 do corpo do parasito, formando junto com a rede subpelicular, o citoesqueleto cortical e conferindo integridade estrutural ao parasito (Morrissette e cols., 1997) (Fig. 1.5).

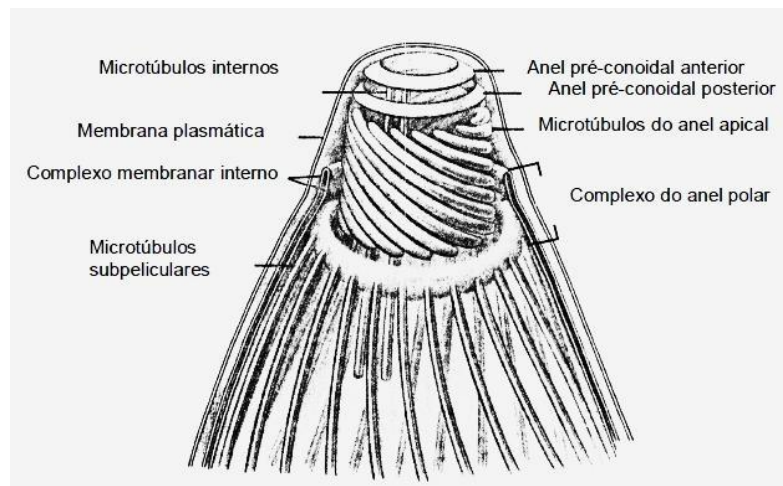


Figura 1.5. Detalhamento da região apical de *Toxoplasma gondii* (retirado de Nichols e Chiappino, 1987)

1.4.3 Micronemas

Localizados na porção anterior do parasito, contêm produtos de secreção envolvidos na adesão e invasão celulares. As proteínas endereçadas a esta organela são denominadas MICs (por exemplo, as AMA1, MICs e a M2AP) e apresentam vários domínios adesivos que medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira, proporcionando o deslocamento do parasito, denominado de *gliding* (Carruthers e Tomley, 2008). A secreção do conteúdo dos micronemas antecede a exocitose das róptrias e é estimulada pela mobilização intracelular de Ca^{++} (Carruthers e Sibley, 1999). A secreção sequencial de proteínas de uma mesma organela ainda não foi elucidada. Foram descritas pelo menos duas populações de micronemas com diferentes conjuntos de proteínas, com vias distintas de transporte e localização subcelular (Kremer e cols., 2013). A proposta da existência de subpopulações de micronemas é reforçada porque é no retículo endoplasmático que são pré-formados complexos de proteínas micronemais (Huynh e cols., 2003; Sheiner e cols., 2010).

1.4.4. Róptrias

As róptrias são organelas delimitadas por uma unidade de membrana, em forma de clava voltada para a extremidade apical do *T. gondii* e formadas por duas regiões: o bulbo e o pescoço. O pescoço das róptrias atua como um duto através do qual seus conteúdos serão secretados. As róptrias se estendem desde o conóide até próximo ao núcleo do parasito (Bradley e cols., 2005), possuem pH ácido e também

contém proteínas básicas denominadas ROPs e RONs. Algumas dessas proteínas têm seu conteúdo secretado durante o processo inicial de invasão celular, logo após a secreção dos micronemas (Carruthers e Sibley, 1997; Dubremetz, 2007; Paredes-Santos e cols., 2012). Até o momento 29 proteínas secretadas pelas róprias, sendo 24 delas no bulbo (ROP) e 5 no pescoço (RON) foram descritas. As RONs formam um complexo com a AMA1, na região da junção móvel (Boothroyd e Dubremetz, 2008). Já as ROPs, liberadas em sequência às RONs, migram para locais diversos, como a membrana do vacúolo parasitóforo, para o interior da célula hospedeira ou para o lúmen do vacúolo parasitóforo em formação.

1.4.5 Grânulos densos

Os grânulos densos são estruturas globulares de aproximadamente 200 nm de diâmetro distribuídas por todo o corpo do parasito. As proteínas dos grânulos densos (as GRAs) são exocitadas, nas regiões lateral e posterior do corpo do parasito, durante e após a sua invasão. Elas permanecem solúveis no lúmen do PV ou tornam-se associadas à MVP ou a rede túbulovesicular de estrutura membranosa dentro do VP (Craver e Knoll, 2007; Travier e cols., 2008). Foram identificadas 12 proteínas GRA (GRA1-GRA14), GRA 11 e 13 são muito semelhantes, além de duas isoformas de nucleosídeo trifosfato hidrolase (NTPase I e II) e dois inibidores de protease (TgPI 1 e 2) (revisto em Nam, 2009). A função dessas proteínas é modificar o ambiente dentro do VP, funcionando assim, para a sobrevivência intracelular e replicação do parasito, promovendo o transporte de íons, lipídeos, carboidratos, ATP e aminoácidos.

1.4.6 Mitocôndria

A mitocôndria é única e ramificada, com um grande número de cristas tubulares que sofrem leve constrição na região de fusão à membrana interna (Sheffield e Melton, 1968; Melo e cols., 2000). Apesar de apresentar um potencial de membrana ativo (Tanabe, 1985), a glicólise é a principal via de produção de energia no *T. gondii* (Denton e cols., 1996). Além disso, alguns ensaios sugerem que a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa são funcionais, embora a via respiratória terminal seja diferente do que no hospedeiro mamífero (Vercesi e cols., 1998).

1.4.7 Apicoplasto

O apicoplasto é uma organela limitada por 4 membranas e foi identificado em meados dos anos 60, mas apenas recentemente foi constatado como um típico plastídio. Daí a origem das quatro membranas, onde a mais externa teria origem do hospedeiro, a membrana subsequente da membrana plasmática da alga vermelha e as duas membranas mais internas seriam derivadas do cloroplasto da alga vermelha (Van Dooren e Striepen, 2013). O apicoplasto apresenta-se como uma característica exclusiva dos membros do filo Apicomplexa, com exceção de *Cryptosporidium* sp. É local de síntese de ácidos graxos do tipo II, biosíntese de isoprenóides e algumas enzimas do metabolismo de carboidratos e sugere-se ter um papel importante na síntese do heme (Fleige e cols., 2007; Van Dooren e Striepen, 2013). Esta organela possui sua divisão acoplada à divisão do parasito e desperta muito interesse como alvo para quimioterapia (Kohler e cols., 1997; Waller e Mcfadden, 2005; Macfadden, 2011).

1.4.8 Acidocalcissomo

Os acidocalcissomos foram primeiramente estudados em parasitos do filo apicomplexa, e depois encontrados em bactérias e algas, os acidocalcissomos, como seu nome já sugere, são organelas que possuem em seu interior um ambiente ácido com grandes quantidades de cálcio. O cálcio encontrado no interior dessas organelas apresenta-se de forma ligada a outras moléculas como cadeias longas e curtas de polifosfato. Recentemente duas enzimas localizadas nos acidocalcissomos com a função de bombear prótons foram descritas: a enzima H^+ pirofosfatase vacuolar e a H^+ ATPase vacuolar. Tais enzimas apresentam-se como uma importante ferramenta na acidificação da organela, que é essencial para manutenção do estoque de Ca^{2+} no interior do acidocalcissomo. Para a liberação do cálcio no citoplasma é necessário a alcalinização com agentes como o NH_4Cl (Moreno e cols., 2011).

1.5 Toxoplasmose

1.5.1 Toxoplasmose em humanos

T. gondii é o agente causador da toxoplasmose, capaz de infectar animais de sangue quente, como o homem. A infecção ocorre após a ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais ou alimentos e água contaminados contendo oocistos, por transfusão ou transplante de órgãos a partir de um indivíduo infectado (Munoz e cols., 2011).

A toxoplasmose é uma infecção oportunista, cosmopolita, comumente assintomática, porém pode se apresentar de forma grave durante a gravidez. Neste caso, pode gerar alterações neurológicas e oftalmológicas no feto, quando adquirida no primeiro trimestre da gestação. Essas manifestações também ocorrem em pacientes imunocomprometidos, como HIV positivos ou durante o tratamento pré-transplante de órgãos (Sarciron e Gherardi, 2000). A toxoplasmose se caracteriza por uma fase aguda, seguida por uma fase crônica quando os parasitos estão presentes em cistos teciduais, predominantemente localizados no cérebro e na musculatura. Estes cistos podem transmitir a infecção para outros hospedeiros quando ingeridos (por carnivorismo).

1.5.2 Epidemiologia da toxoplasmose no Brasil

No Brasil, a infecção por *T. gondii* é altamente prevalente em todas as regiões afetando humanos e animais. Em humanos, mais de 50% de crianças no ensino fundamental e 50-80% de mulheres em idade fértil possuem anticorpos para *T. gondii*. O risco para mulheres não infectadas de adquirir toxoplasmose durante a gravidez e assim transmitir para o feto é alta, devido ao ambiente ser altamente contaminado por oocistos (Dubey e cols., 2012). Em Campos dos Goytacazes, na região norte do estado do Rio de Janeiro, onde relatos de uveítes, consistentes com toxoplasmose, levou a uma pesquisa da prevalência e fatores de risco para infecção por *T. gondii* entre os anos de 1997 e 1999. Esta pesquisa mostrou que 84% da população em grupos socioeconômicos mais baixos eram soropositivos, comparado com 62% e 23% da classe socioeconômica média e alta, respectivamente. A água não filtrada foi indicada como um fator de risco nessa região, revelando a importância da transmissão de oocistos através da água (Bahia-Oliveira e cols., 2003).

Com isso, é possível constatar alto índice de crianças congenitamente infectadas. Em pesquisas da infecção por *T. gondii* em recém-nascidos, 5-23 recém-nascidos eram infectados a cada 10 mil nascidos vivos no Brasil. Em consequência disso, dados clínicos obtidos nas últimas décadas no Brasil mostraram que aproximadamente 35% das crianças infectadas por toxoplasmose congenitamente, apresentaram doenças neurológicas, incluindo hidrocefalia, microcefalia e retardo mental, e aproximadamente 80% apresentaram lesões oculares. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) são esperados no Brasil em 2015 cerca de 2.649.396 nascidos vivos. Se assumir a faixa de uma criança infectada por toxoplasmose congênita a cada 1000 nascimentos, é provável, portanto, o nascimento de 2649 crianças infectadas com toxoplasmose congênita anualmente no Brasil. A maioria dessas crianças infectadas provavelmente desenvolverá alguns sintomas ou sinais clínicos da toxoplasmose (Dubey e cols., 2012).

1.5.3 Tratamento da toxoplasmose

A terapia vigente para o tratamento agudo da toxoplasmose consiste na combinação sinérgica de pirimetamina (inibidor da diidrofolato redutase) e da sulfadiazina (inibidor da timidilato sintase). Essa combinação terapêutica atua bloqueando a via metabólica da síntese do ácido fólico e folínico, comprometendo assim a síntese de timidina e a consequente replicação do parasito. Essas substâncias associadas atuam contra o *T. gondii* com uma atividade oito vezes maior do que se fossem utilizadas isoladamente. Um dos efeitos colaterais relacionados a esta terapia é causado pela pirimetamina, que inibe a dihidrofolato redutase, a qual é importante na síntese do ácido fólico, levando à depressão reversível e geralmente gradual da medula óssea, sendo a neutropenia (reversível) a ação tóxica mais importante. Além disso, a super dosagem acidental da pirimetamina em crianças pode resultar em vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea (Diniz e Vaz, 2003).

Devido aos efeitos colaterais encontrados, são recomendadas, em alguns casos, terapias alternativas. Em casos de intolerância à sulfa, a substituição desta por clindamicina é recomendada, pois a combinação pirimetamina-clindamicina é tão efetiva quanto a associação da primetamina-sulfadiazina durante a fase aguda da doença (Ng e McCluskey, 2002).

No caso do tratamento visando prevenção de infecções congênitas, o uso de espiramicina é recomendado durante o primeiro trimestre da gravidez, pois ao contrário dos antifolatos, essa droga não atravessa a barreira placentária, não causando danos ao neonato. Entretanto, seu efeito microbicida é menos efetivo (Nath e Sinai, 2003).

Nos casos específicos de toxoplasmose ocular, recomenda-se a administração concomitante de um corticóide (Sumyuen e cols., 1996), de modo a prevenir reações de hipersensibilidade e minimizar as manifestações inflamatórias locais. Esta recomendação visa reduzir as chances de danos teciduais que possam comprometer irreversivelmente a visão do paciente (Ng e McCluskey, 2002).

Pacientes imunocomprometidos, com base na contagem de células T CD4⁺, devem sempre se submeter a uma terapia preventiva. A mais utilizada também é baseada na ação sinérgica entre a sulfadiazina e a pirimetamina. Durante os períodos agudos da doença o tratamento primário é geralmente idêntico àquele utilizado em pacientes imunocompetentes que possam vir a apresentar manifestações clínicas. Já o tratamento preventivo é normalmente ministrado baseado em concentrações mais baixas das drogas. A duração do tratamento deve ser associada à manifestação dos sintomas ou ao restabelecimento imune do paciente (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Outros compostos como claritromicina e azitromicina, inibidores da síntese de proteínas no apicoplasto ou a dapsona, cujo mecanismo de ação não está elucidado, podem ser utilizados associados à pirimetamina em casos de refratariedade à profilaxia rotineira (Liesenfeld e cols., 1999).

A grande problemática do atual tratamento da toxoplasmose é que os compostos utilizados atuam apenas contra os taquizoítos, e possuem pouco ou nenhum efeito sobre bradizoítos, que são mantidos em cistos teciduais como fonte recrudescente da infecção (Luft e Remington, 1992; Montoya e Liesenfeld, 2004).

1.5.4 Atovaquona

Atovaquona é uma naftoquinona, com atividade antiprotozoário de amplo espectro, efetiva para o tratamento e prevenção de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*. Ministrada em combinação com proguanil é utilizada para o tratamento e prevenção da malária e em combinação com azitromicina para o tratamento de babesiose. Embora a ação antimicrobiana de naftoquinonas seja

demonstrada há mais de 50 anos, triagens clínicas levaram à aprovação de Atovaquona pela Agência de Regulamentação Americana *Food and Drug Administration* (FDA) apenas ao longo da última década (Baggish e Hill 2002).

O efeito da atavacona na respiração celular e a similaridade estrutural com o ubiquinol sugerem que o alvo de ação do composto seja o complexo bc1. O complexo citocromo bc1 é uma enzima respiratória essencial presente no complexo interno da membrana mitocondrial de organismos eucarióticos (Kessl e cols., 2003). O complexo bc1 catalisa a transferência de elétrons de ubiquinol de citocromo c e concomitantemente transloca prótons através das membranas. Esta proposta de mecanismo de ação tem como suporte o desenvolvimento de mutações no gene do citocromo b, coincidindo com a resistência ao composto (Kessl e cols., 2003).

Para toxoplasmose, Atovaquona em concentrações na faixa de 20 nM e 60 nM mostrou alto nível de atividade contra taquizoítos em culturas de células infectadas tratadas com Atovaquona sozinha ou combinada com outros compostos, como o Rifabutin (Romand e cols., 1996; Meneceur e cols., 2008), e em modelos *in vivo* contra taquizoítos apresentou eficácia nas concentrações de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg e sua atividade apresentou-se potencializada quando combinada com outros compostos como a clindamicina (Djurković-Djaković e cols., 1999), e em concentrações maiores apresentou também atividade contra bradizoítos no interior de cistos teciduais. Em modelos murinos de toxoplasmose, Atovaquona foi menos efetiva, necessitando da combinação com outros agentes para melhor desempenho (Araújo e cols., 1991; Romand e cols., 1993; Baggish e Hill 2002). Atualmente, o maior enfoque dos testes clínicos com este composto está voltado para pacientes com AIDS. Neste grupo de pacientes, uma das maiores problemáticas relacionadas à infecção com *T. gondii*, é a reativação da infecção no sistema nervoso central, principalmente em pacientes com imunossupressão avançada. Embora pirimetamina em combinação com sulfadiazina ou clindamicina são a terapia de escolha e utilizadas também como profilaxia, alguns pacientes são intolerantes a estes regimes e requerem terapias alternativas (Baggish e Hill, 2002).

1.6 3-Bromopiruvato

1.6.1 Efeito sobre células cancerígenas

O análogo do ácido pirúvico 3-Bromopiruvato (3-BrPA) (Fig. 1.6), foi inicialmente utilizado na química analítica para marcação dos alvos de afinidade de proteínas, porém ao longo dos anos, o crescimento de evidências documentavam a habilidade de 3-BrPA de inibir diversas enzimas metabólicas. Na última década uma importante habilidade deste composto foi divulgada, os efeitos anticâncer descritos por Geschwind e colaboradores (2002), demonstravam a capacidade de 3-BrPA de induzir efetivamente a morte da maior parte de células cancerígenas em tumores primários de fígado implantados em coelhos. A partir disto, diversos trabalhos foram publicados mostrando a eficiência do composto em erradicar cânceres avançados. 3-BrPA mostrou-se um potente inibidor das vias de síntese de ATP, levando à inibição da proliferação das células cancerígenas sem aparente toxicidade ou recorrência (Ko e cols., 2004; Kim e cols., 2007; Cardaci, 2012). Ko e colaboradores (2004) demonstraram a habilidade de 3-BrPA em erradicar câncer em um curto período de tratamento em modelos de câncer hepático em roedores.

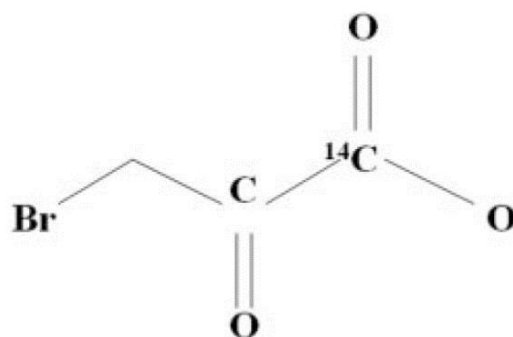


Figura 1.6 Estrutura do composto 3-BrPA (retirado de Vali e cols., 2008).

Além da eficiência na terapêutica de câncer *in vitro* e *in vivo*, estudos têm demonstrado a seletividade de 3-BrPA. No modelo VX2 de câncer hepático não se observou dano nos tecidos circundantes ao tumor tratado com 0,5 mM de 3-BrPA (Geschwind, 2002). Em animais saudáveis tratados com 1.75 mM 3-BrPA não apresentaram indícios de toxicidade nas análises histopatológicas (Vali e cols., 2008), porém ainda são necessários estudos para elucidar os mecanismos que levam a esta seletividade.

A partir dos relatos da eficiência deste composto sobre diversos modelos de cânceres em animais e a aparente seletividade do composto, recentemente foi publicado um relato de caso de um paciente com hepatocarcinoma *fibrolamelar* tratado com 3-BrPA que teve a qualidade de vida melhorada após o tratamento com o composto (Ko e cols., 2012). Visto estes resultados promissores, espera-se que 3-BrPA seja utilizado futuramente como uma terapêutica de câncer.

1.6.2 Mecanismo de ação

Estudos relatam que o principal alvo da inibição por 3-BrPA seria a Hexoquinase II (Ko e cols., 2001), enzima responsável pela fosforilação na posição 6 da glicose formando o composto glicose 6-fosfato na primeira reação da via glicolítica. No entanto, 3-BrPA foi também descrito como um inibidor, em várias linhagens celulares, da enzima Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), enzima da via glicolítica que leva à oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato. Conforme demonstrado por Ganapathy-Kanniappan e colaboradores (2009), a ação de 3BrPA sobre GAPDH afeta negativamente a sua função enzimática e provoca a morte celular por apoptose. No entanto, as vias de sinalização que ligam a inibição da enzima e o envolvimento da maquinaria apoptótica não foi investigada. Pereira da Silva e colaboradores, (2009) também demonstraram a inibição de GAPDH por 3-BrPA em linhagens de câncer hepático, além da enzima fosfogliceratoquinase, que atua na transferência do fosfato do 1,3-difosfoglicerato para o ADP, sendo ATP e 3-fosfoglicerato os produtos da ação desta enzima.

1.6.3 Ação sobre micro-organismos

Em micro-organismos 3-BrPA apresentou efeito inibitório no crescimento celular de variadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração mínima de 1,8 mM, apresentando como via de entrada o simportador Jen1p de lactato/piruvato

(Lis e cols., 2012). Quando utilizado contra o patógeno humano *Cryptococcus neoformans* 3-BrPA apresentou uma concentração inibitória mínima de 120 μM , e essa ação inibitória apresentou-se correlacionada com a elevada acumulação intracelular de 3-BrPA e também com baixos níveis de ATP e glutatona intracelular (Dylag e cols., 2013).

Em protozoários, este composto foi testado em *Trypanosoma brucei*, no qual apresentou efeitos inibitórios sobre (i) a motilidade do parasito na concentração 13.4 μM e, (ii) o efluxo de piruvato na concentração de 5.6 μM , devido ao bloqueio na enzima GAPDH, apresentando IC_{50} de 2.67 μM . Tais efeitos levaram à menor viabilidade dos parasitos (Barnard e cols., 1993; Vanderheyden e cols., 2000).

Esse conjunto de dados nos impulsionou a propor esse projeto, com base nas seguintes justificativas: (1) que 3-BrPA tem habilidade em destruir cânceres avançados altamente glicolíticos sem aparente toxicidade ou recorrência (Ko e cols., 2004); (2) que este composto possui ação bloqueando algumas enzimas da via glicolítica em diferentes modelos celulares (Pereira da Silva e cols., 2009), e (3) que este composto testado sobre o protozoário *Trypanosoma brucei*, apresentou efeitos inibitórios sobre viabilidade do parasito, atuando sobre a motilidade e o efluxo de piruvato devido ao bloqueio na enzima Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Barnard e cols., 1993; Vanderheyden e cols., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o efeito de 3-BrPA, Atovaquona e a combinação destes sobre parasitos intracelulares.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Analisar o efeito dos compostos 3-BrPA e Atovaquona sobre a proliferação de células LLC-MK₂;

2.2.2 Analisar o efeito do composto 3-BrPA sobre o crescimento de taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH, em células LLC-MK₂;

2.2.3 Avaliar, ultraestruturalmente, o efeito de 3-BrPA sobre formas taquizoítos intracelulares em LLC-MK₂ visando verificar sua ação sobre o desenvolvimento do parasito;

2.2.4 Monitorar a cistogênese *in vitro* de culturas infectadas e tratadas com 3-BrPA;

2.2.5 Associar os compostos 3-BrPA e Atovaquona e verificar se há efeito sobre a proliferação de taquizoítos em células LLC-MK₂;

2.2.6 Analisar o consumo de oxigênio de taquizoítos de *T. gondii* provenientes do tratamento *in vitro* e *in vivo* com 3-BrPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais, da Fundação Oswaldo Cruz, Resolução 242/99 através da licença CEUA LW 10-10 e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos.

3.1 Diluição e preparação dos compostos

A solução de 3-BrPA utilizada nos ensaios deste trabalho foi preparada em DMEM, pH 7,4, para os ensaios *in vitro*, e em PBS, pH 7,4, para os ensaios *in vitro*, para uma concentração final de estoque de 10 mM de 3-BrPA e quando necessário, diluições adicionais foram realizadas utilizando os mesmos diluentes.

O composto Atovaquona foi diluído em uma solução de álcool e acetona, numa solução estoque de 1 mg/ml.

3.2 Cultura de Células

A linhagem celular epitelial LLC-MK₂ Original (ATCC® CCL7™), isolada do rim de macaco Rhesus, *Macaca mulata*, foi cultivada em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 5% soro fetal bovino (SFB) e mantida em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os subcultivos foram realizados por dissociação celular enzimática com tripsina à 0,25%, seguido de contagem e redistribuição à novas garrafas. Esse procedimento foi repetido quando as células alcançavam confluência de cerca de 90% que em média ocorria a cada 48h.

3.3 Parasitos

Taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH, foram mantidos em camundongos da linhagem CF1 por inoculações intraperitoneais seriadas, com inóculos variados entre 10⁵ e 10⁶ parasitos por camundongo em solução tampão de fosfato (PBS). Após 48h, os parasitos foram recolhidos por lavado peritoneal utilizando PBS, pH 7.2. A suspensão celular foi centrifugada a 200g por 5 min para remover células sanguíneas e debris celulares. O sobrenadante contendo taquizoítos foi coletado e centrifugado à 1000g por 10 min. Os taquizoítos foram ressuspensos em DMEM, quantificado em câmara de Neubauer e utilizados nos ensaios experimentais.

3.4 Efeito de 3-BrPA e Atovaquona na proliferação das células LLC-MK₂

Células LLC-MK₂ foram plaqueadas e após aderência mantidas com meio DMEM suplementado com 5% de SFB com adição de 10 µM de 3-BrPA diluída em meio DMEM, 50 nM de Atovaquona diluída em solução de álcool e acetona, após os períodos de incubação de 24 h, 48 h e 6 dias as células foram fixadas em solução de 4% paraformaldeído em tampão fosfato, coradas com eosina azul de Metileno segundo Giemsa a 10% no mesmo tampão, desidratadas em diferentes concentrações de acetona-xilol e montadas com Entellan[®]. O material foi analisado ao microscópio óptico Axioplan – Zeiss para verificar o índice de proliferação celular, considerando-se o número total de 10 campos por lamínula, em duplicata. Outras culturas mantidas nas mesmas condições experimentais foram coletadas e a viabilidade celular analisada pelo teste de exclusão com azul de tripan a 0,4%, considerando-se o número total de 200 células. Estão sendo apresentados os resultados de três experimentos diferentes em duplicata. A análise estatística foi desenvolvida utilizando-se o teste t de “Student” como ferramenta, sendo os resultados significativos quando $p \leq 0.05$.

3.5 Avaliação do efeito dos compostos sobre a proliferação de *T. gondii* em células LLC-MK₂

Células LLC-MK₂ foram plaqueadas e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, após 1h, as culturas foram lavadas com PBS para retirada dos parasitos extracelulares. O tratamento das culturas iniciou-se após a retirada dos parasitos extracelulares com a adição de 3-BrPA, Atovaquona ou 3-BrPA e Atovaquona juntos, o tratamento estendeu-se por 24 h, 48 h e 6 dias. Após os períodos de tratamento, as culturas foram fixadas em solução de 4% de formaldeído em PBS, coradas com eosina azul de metileno a 10% em solução de tampão fosfato, desidratadas em diferentes concentrações de acetona-xilol e montadas com Entellan[®]. O material foi analisado ao microscópio óptico Axioplan – Zeiss para verificar a proliferação celular parasitária, considerando-se o número total de 200 células em duplicata, de cada condição experimental. Estão sendo apresentados os resultados de três experimentos diferentes em duplicata. A análise estatística foi desenvolvida utilizando-se o teste t de “Student” como ferramenta, sendo os resultados significativos quando $p \leq 0.05$.

3.6 Análise do potencial inibitório dos compostos 3-BrPA e Atovaquona

Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% dos parasitos intracelulares.

3.7 Análise do potencial sinérgico do tratamento com a combinação de 3-BrPA e Atovaquona

O estudo da ação combinada de 3-BrPA e Atovaquona foi efetuada através do cálculo da concentração inibitória fracional (FIC) para cada combinação, segundo a fórmula: $FIC = (IC_{50} \text{ 3-BrPA combinado} / IC_{50} \text{ 3-BrPA}) + (IC_{50} \text{ Atovaquona combinada} / IC_{50} \text{ Atovaquona})$. A relação entre os compostos foi caracterizada da seguinte forma: $FIC \leq 0,5$ = Sinergismo; $FIC \geq 2,0$ = Antagonismo; $0,5 < FIC < 1$ = Sinergismo Parcial; $FIC = 1$ = Efeito aditivo.

3.8 Análise ultraestrutural do efeito de 3-BrPA sobre *T. gondii* em células LLC-MK₂

Após 6 dias de interação de *T. gondii* e células LLC-MK₂ na ausência e presença de 3-BrPA 10 µM, as células foram fixadas em solução de 2.5% glutaraldeído e 4% de formaldeído em PBS, desidratadas em soluções de acetona (30 à 100%), secas usando o aparelho de ponto crítico de CO₂ CDP 030BAL-TEC[®], e montadas em “stubs”. A membrana celular foi retirada com técnica “scotch tape” para exposição da face citoplasmática da célula. As amostras foram metalizadas com ouro (20–30 nm) utilizando o metalizador SCD-050 BAL-TEC[®], e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 6490LV do Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia da UEZO. Outro método foi a análise por MET de cortes ultrafinos durante esses eventos. As culturas foram fixadas em solução de 2.5% glutaraldeído e 4% de formaldeído por 1 h a 4°C diluído em 0.1M de tampão cacodilato de sódio, seguida da lavagem no mesmo tampão e pós-fixadas em solução a 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) em 0.1M de tampão cacodilato de sódio por 30 min a 4°C. A desidratação foi realizada em soluções de acetona (30 a 100%). Em seguida, as amostras foram embebidas em resina epóxi e polimerizadas a 60°C por 72 h. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo EM-UC-6 Leica[®], e coletados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM-1011 da

Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz – IOC - Fiocruz.

3.9 Monitoramento da cistogênese *in vitro*

Células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos da cepa RH, e após tratamentos, foram lavadas e fixadas em 4% formaldeído diluído em PBS. A seguir foram permeabilizadas com Triton X-100 e incubadas com 50 mM de cloreto de amônio para bloqueio dos radicais aldeídos livres, e com albumina de soro bovino (BSA) à 3%, para bloqueio das ligações inespecíficas. Após os bloqueios, as células foram incubadas por 1 hora com a lectina *Dolichos biflorus* conjugada a fluoresceína (DBA-FITC) (10 µg/ml) para identificação de cistos nas culturas, considerando-se que esta lectina reconhece sítios de N-acetil-galactosamina presentes na parede cística. Para ensaio de imunofluorescência indireta, visando o reconhecimento de taquizoítos, as culturas foram incubadas durante 2 h a 37°C com anticorpo primário anti-P30, que reconhece proteínas da superfície de taquizoítos, diluído 1:100 em solução de 4% BSA em PBS. A seguir, as células foram lavadas e reincubadas durante 1 h a 37°C com anticorpo secundário (anti IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor[®] 546) em diluição de 1:600 em solução de 4% BSA em PBS. As células foram lavadas e montadas com o reagente ProLong[®] Gold antifade com DAPI (4',6 - Diamidino - 2 - phenylindole, Invitrogen) e observadas ao Microscópio Confocal a laser (LSM-710, Zeiss). Para a quantificação do percentual dos vacúolos com marcação positiva para DBA-FITC foram consideradas 200 células infectadas, e estão sendo apresentados os resultados de três experimentos diferentes em duplicata. A análise estatística foi desenvolvida utilizando-se o teste t de “Student” como ferramenta, sendo os resultados significativos quando $p \leq 0.05$.

3.10 Análise do consumo de oxigênio de *T. gondii*

Células LLC-MK₂ plaqueadas em frascos de cultura foram infectadas com taquizoítos e, após 1h, foram lavadas e mantidas na presença e ausência do composto 3-BrPA 10 μ M. Após 6 dias, as células foram retiradas dos frascos mecanicamente, e os parasitos removidos das células LLC-MK₂ por passagem em agulhas, e o debris celular retirado por centrifugação e passagem por membrana de 3 μ M. Para avaliação da abordagem experimental *in vivo*, camundongos foram inoculados com 10^4 taquizoítos, e após 1 dia de infecção separados em 2 grupos: Grupo controle: tratados diariamente com PBS via intraperitoneal, e Grupo Tratado: tratados diariamente com 3-BrPA diluído em PBS. Após 6 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados e o lavado peritoneal coletado. De ambas as abordagens foram utilizados $5 \cdot 10^7$ parasitos, que foram adicionadas ao meio de respiração contendo: 0,25M manitol, 0.1% de ácidos graxos sem BSA, 10 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.2. As taxas de consumo de oxigênio foram mensuradas usando um respirômetro de alta resolução (OROBOROS® Oxygraph-2K, Instruments, Innsbruck, Áustria) do Laboratório de Bioquímica Celular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Estão sendo apresentados os resultados de três experimentos diferentes em duplicata. A análise estatística foi desenvolvida utilizando-se o teste t de “Student” como ferramenta, sendo os resultados significativos quando $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de 3-BrPA e Atovaquona na proliferação das células LLC-MK₂

Afim de garantir que 3-BrPA e Atovaquona não comprometiam a viabilidade das células LLC-MK₂, ensaios experimentais foram desenvolvidos utilizando as concentrações máximas de 10 μ M de 3-BrPA e 50 nM de Atovaquona que seriam empregadas nos estudos de interação *T. gondii*-LLC-MK₂. A estratégia usada foi variar o tempo de exposição do composto frente às células em comparação às culturas não tratadas, considerando-se a capacidade proliferativa destas células. A figura 4.1 mostra que não houve interferência dos compostos na proliferação de células LLC-MK₂ no período que variou de 24 h até 6 dias de exposição das células aos compostos. Além disso, empregamos o azul de tripan para a análise da viabilidade celular. Assim, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, a viabilidade celular manteve-se maior que 93% nos diferentes tempos de tratamento.

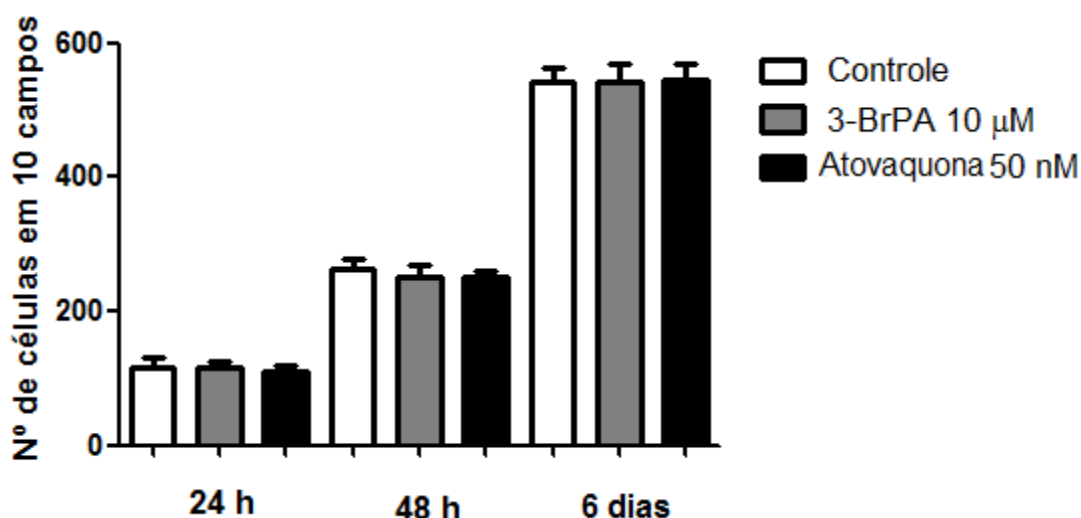


Figura 4.1 A- B. Efeito do tratamento de 3-BrPA 10 μ M e Atovaquona 50 nM sobre células LLC-MK₂ quanto a proliferação celular, após 24 h, 48 h e 6 dias de tratamento.

4.2 Efeito do composto 3-BrPA sobre a proliferação de *T. gondii*, cepa RH, durante a sua interação com células LLC-MK₂

Culturas foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* inicialmente na proporção de 3:1, após foram lavadas e cultivadas por 24 h (grupo controle). Outras culturas, após o período de 1 h de infecção, foram tratadas por 24 h com 3-BrPA nas

seguintes concentrações: 1 μM , 2,5 μM , 10 μM ou 15 μM . Os resultados demonstraram que independente do esquema do tratamento com 3-BrPA não houve diferença significativa no percentual de células infectadas (Fig. 4.2A). A análise do número de parasitos por 200 células mostrou que as células tratadas apresentaram menor número de parasitos intracelulares em concentrações na faixa de μM com uma inibição de cerca de 42%, a partir de 10 μM , e o IC_{50} $11,9 \pm 3 \mu\text{M}$ (Fig. 4.2B).

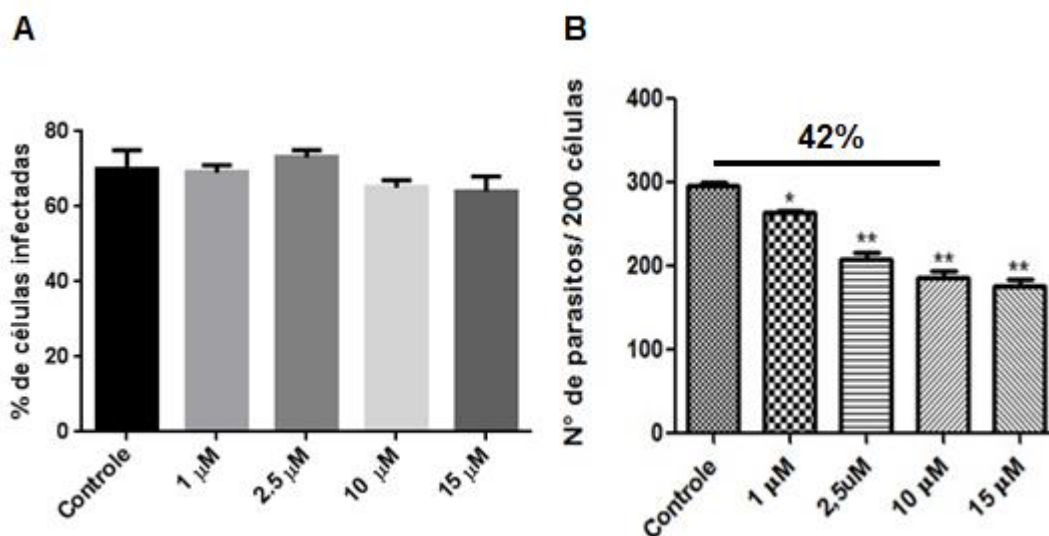


Figura 4.2 A- B. Efeito do tratamento de variadas concentrações de 3-BrPA sobre o percentual de células LLC-MK₂ infectadas com *T. gondii* (A), e sobre o número de parasitos intracelulares na proporção de infecção de 3:1parasito:célula (B).

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$

Com base nestes resultados, decidimos analisar o seu efeito na concentração de 10 μM de 3-BrPA, que foi efetiva na redução do número de parasitos intracelulares, e introduzimos a proporção de 5:1 parasitos por célula hospedeira nessas análises. Culturas infectadas por 1 h nestas condições e tratadas por períodos de 24 e 48 h mostraram redução significativa ($p \leq 0.05$) do percentual de células infectadas somente após 48 h de interação com uma inibição de 15% comparado com o controle (Fig. 4.3A). Com relação à análise da proliferação celular após 24 e 48 h observamos uma redução do número de parasitos de 55% e 61%, respectivamente, quando comparado ao controle sem o composto (Fig. 4.3B).

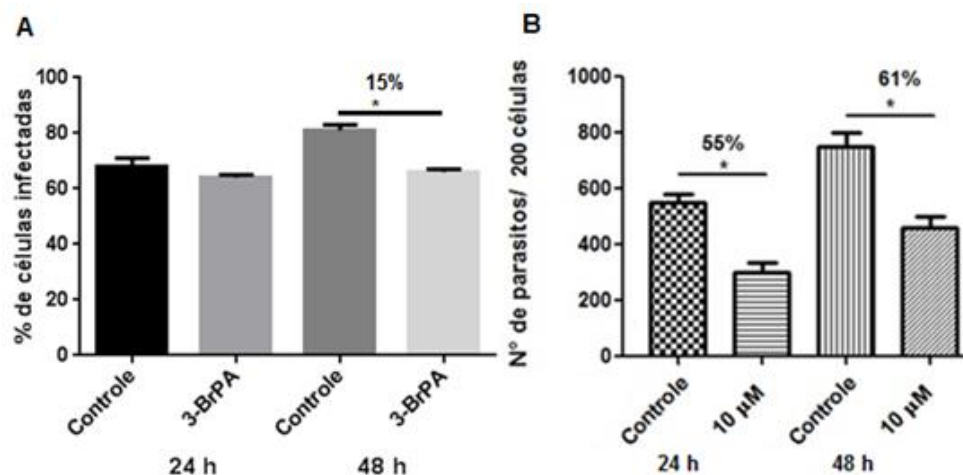


Figura 4.3 A-B. Análise do percentual de células infectadas e número de parasitos na interação de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH e células LLC-MK₂ na proporção 5:1 parasitos:célula. Culturas mantidas sob o tratamento com 10 μM de 3-BrPA após 24 e 48 h de interação, e o efeito do composto sobre o percentual de células infectadas (A) e sobre o número de parasitos intracelulares (B).

* p ≤ 0.05

Culturas de células LLC-MK₂ infectadas na proporção de 5:1 parasito:célula hospedeira, foram mantidas sem tratamento como controle da infecção. Nota-se, após 24 h de interação células com vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos em forma de rosetas, estando infectadas a maioria das células (Fig. 4.4A). No entanto, quando as culturas foram infectadas nas mesmas condições, porém tratadas com 10 μM de 3-BrPA, observa-se menor número de células infectadas (Fig. 4.4B e C) e poucos vacúolos parasitóforos com características compatíveis com formação de rosetas, predominando vacúolos apenas com dois parasitos cada (Fig. 4.4C).

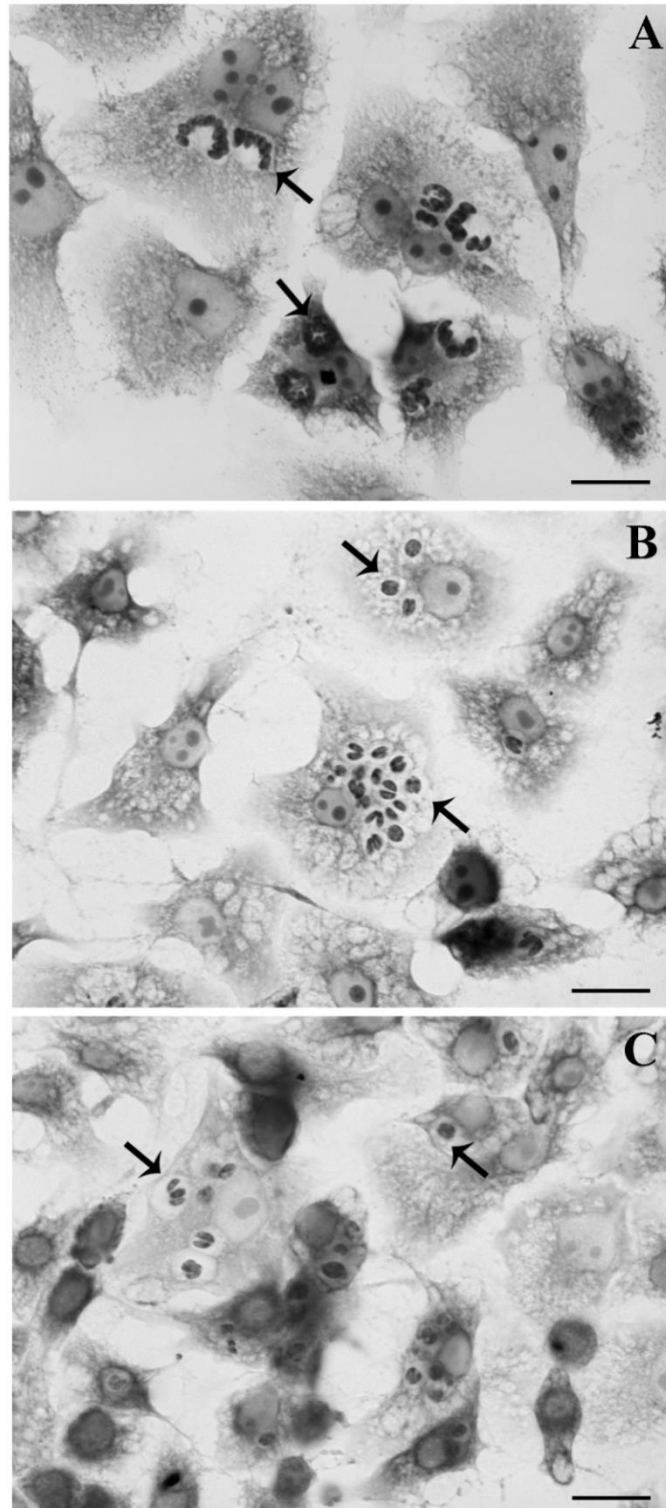


Figura 4.4 A-C. Análise por microscopia óptica de células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii* após 24 h de infecção, na proporção de parasito:célula de 5:1. Nota-se, no grupo controle, células com vacúolos parasitóforos contendo parasitos em formação de rosetas e a maioria das células infectadas (A). No grupo tratado com 3-BrPA, 10 μ M observa-se menor número de células infectadas e células contendo parasitos aos pares, indicativo de atividade proliferativa (B e C). Barras: 20 μ M.

Após 48 h as células infectadas mantidas como controle apresentaram vacúolos parasitóforos com formação característica de rosetas e diversas células infectadas como demonstrado na análise quantitativa (Fig. 4.5A). As células mantidas sob o tratamento com 3-BrPA, apresentaram poucas células infectadas (Fig. 4.5 B e C).

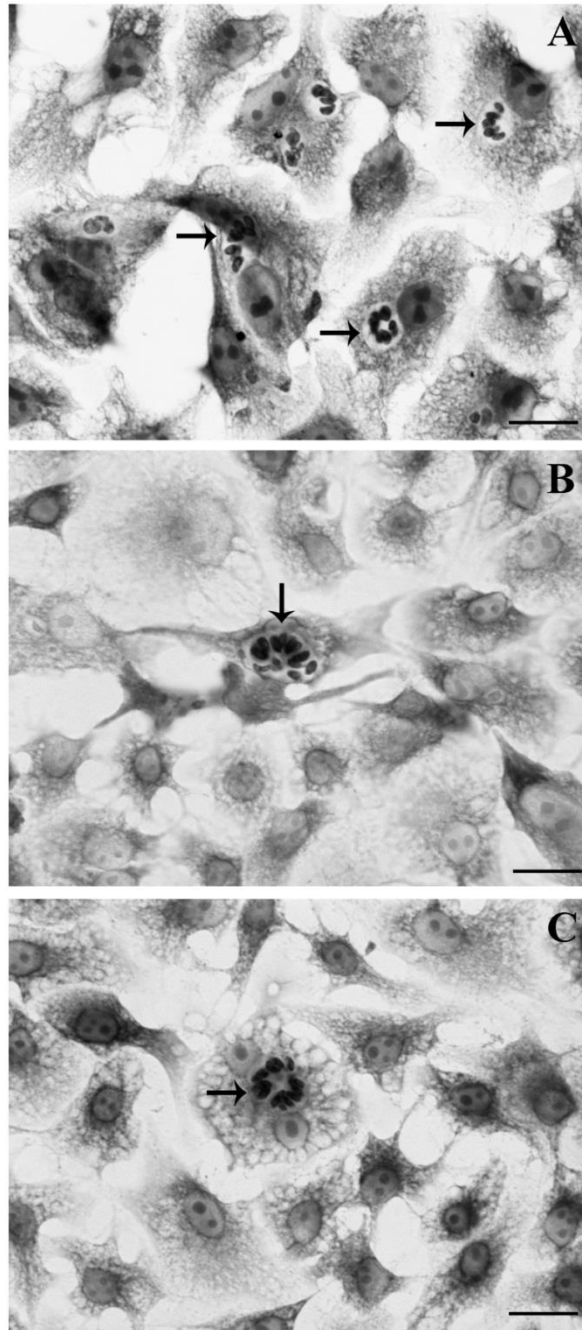


Figura 4.5 A-C. Análise por microscopia óptica de células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii* após 48 h de infecção. Observam-se nas culturas de células mantidas como controle, vacúolos parasitóforos característicos da formação de rosetas (A). Nas culturas mantidas sob o tratamento com 10 μ M de 3-BrPA, nota-se poucas células infectadas (B e C). Barras: 20 μ M.

As culturas foram observadas até 6 dias pós-infecção e a análise do percentual de células infectadas demonstrou que houve uma redução significativa ($p \leq 0.05$) de 21% nas culturas tratadas (Fig. 4.6) .

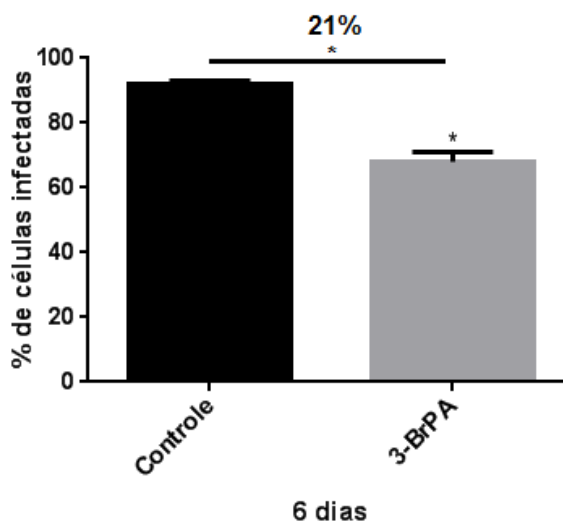


Figura 4.6 Interação de *T. gondii* da cepa RH em células LLC-MK₂ na proporção 3:1 sob o tratamento com 10 μ M de 3-BrPA após 6 dias de interação.

* $p \leq 0.05$

Culturas mantidas sem tratamento apresentaram vacúolos contendo grande número de parasitos e diversas células rompidas com liberação dos parasitos no meio extracelular (Fig. 4.7A). Enquanto isso, nas culturas mantidas sob o tratamento com 3-BrPA, observam-se vacúolos parasitóforos com grande quantidade de parasitos desorganizados, apresentando características muito semelhantes às encontradas em cistos teciduais, a saber: vacúolos com alta concentração de parasitos e maior espessura da membrana que envolve os parasitos, compatível com a característica morfológica da parede cística (Fig. 4.7B e C).

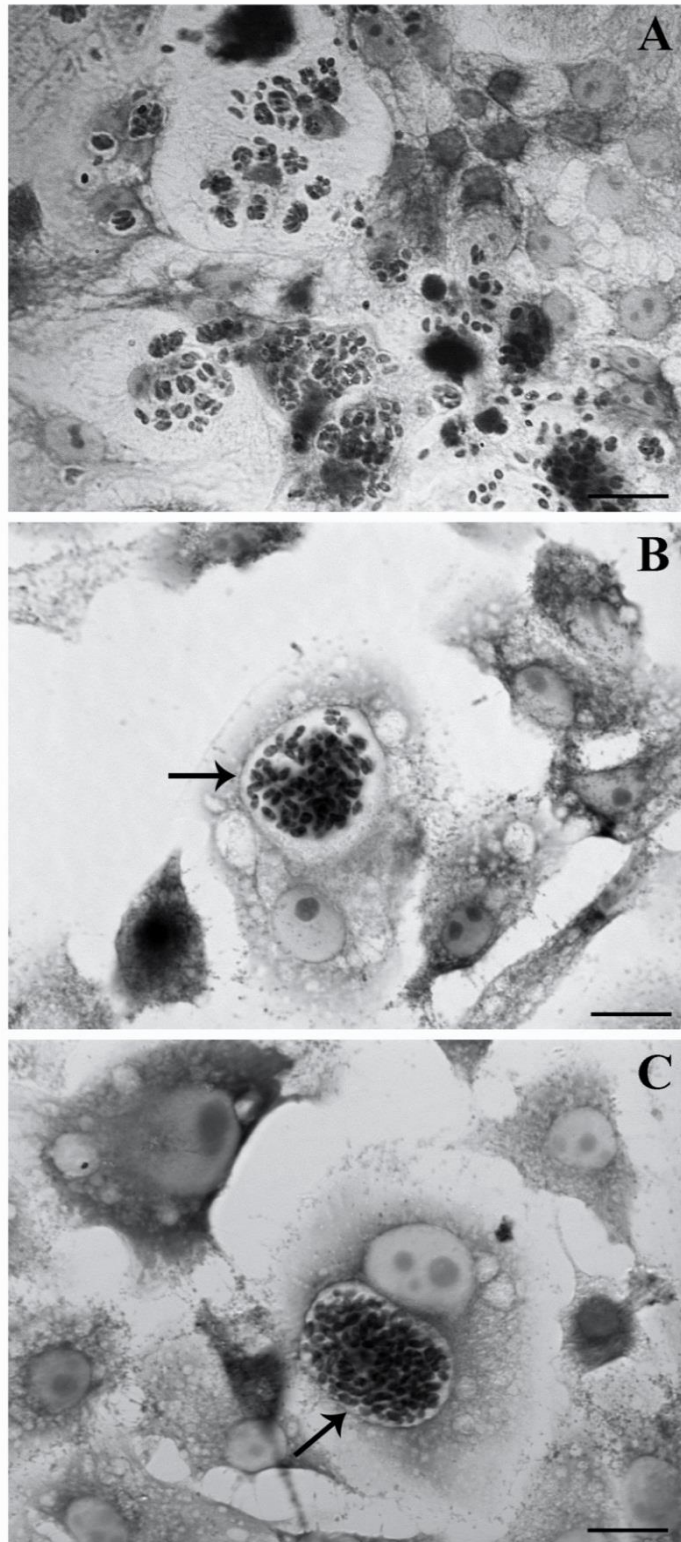


Figura 4.7 A-C. Células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii* na proporção 5:1, observadas por microscopia óptica 6 dias pós infecção. Notam-se nas culturas mantidas na ausência de 3-BrPA, parasitos em diferentes estágios de desenvolvimento, apresentando vacúolos com rosetas, em duplas e também células aparentemente lisadas (A). Nas culturas mantidas sob o tratamento com 10 μ M de 3-BrPA, observou-se vacúolos com estruturas semelhantes aos cistos teciduais (B e C). Barras: 20 μ M.

4.3. Avaliação ultraestrutural por MEV do efeito de 3-BrPA sobre formas taquizoítos intracelulares em LLC-MK₂

Cultura de células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, foram observadas ultraestruturalmente durante 6 dias pós infecção. Na ausência de 3-BrPA, observam-se parasitos organizados em vacúolos parasitóforos em formação de rosetas, característica do modelo de multiplicação de taquizoítos (Fig. 4.8A-C).

Entretanto, sob o tratamento com 3-BrPA foi possível verificar que os parasitos, em grande quantidade, acomodavam-se em vacúolos de forma desorganizada. Ademais, estas estruturas apresentavam características semelhantes aos cistos teciduais (Fig. 4.9 A-C).

4.4 Avaliação ultraestrutural por MET do efeito de 3-BrPA sobre a interação de *T. gondii* em células LLC-MK₂

Nas culturas controle, observa-se a maioria dos parasitos íntegros com boa preservação ultraestrutural (Fig. 4.10 A-D). Células contendo parasitos em dupla, indicativo de infecção e de divisão celular recentes, apresentam boa preservação da membrana do vacúolo (Fig. 4.10 A). Em decorrência do estabelecimento do ciclo lítico nesse período de 6 dias de interação, alguns parasitos egressaram das células mostrando excelente características morfológicas ultraestruturais (Fig. 4.10B). Foi frequente observarmos células com múltiplos vacúolos apresentando número variável de parasitos intravacuolares e alguns destes parasitos exibiam alterações ultraestruturais compatíveis com morte celular, ao lado de vacúolos contendo parasitos íntegros (Fig 4.10 C e D).

Após 6 dias de tratamento com 10 µM de 3-BrPA, notamos uma grande incidência de células contendo vacúolos com múltiplos parasitos em diferentes estágios de diferenciação e preservação ultraestrutural. Como pode ser observado na figura 4.11 A, a célula apresenta mais de um vacúolo, sendo que o vacúolo em destaque contém dois parasitos com boa preservação das estruturas celulares, onde se pode

evidenciar o complexo apical. Os outros dois parasitos parecem ainda associados ao corpo residual bastante volumoso, cuja morfologia difere do padrão (Fig.4.11A). Uma outra alternativa para descrição desta imagem poderia ser interpretada como uma expansão citoplasmática do corpo de um dos parasitos. A morfologia do vacúolo mostra ainda, a rede túbulovesicular rarefeita e bastante escassa. Estruturas semelhantes a grânulos de amilopectina podem ser detectados em três dos parasitos visualizados nessa imagem (Fig. 4.11A).

As figuras 4.11B, C e C' mostram vacúolos com múltiplos parasitos comumente observados nessas células tratadas. Os danos estruturais foram mais evidentes mostrando parasitos altamente vacuolizados, tumefação celular, parasitos que perderam a forma típica de arco, a incidência concomitante de parasitos em divisão celular tipicamente assincrônica e ainda, debris celulares, como resultado de morte celular dos parasitos. Detalhes destas alterações podem ser melhor visualizadas em maior aumento na figura 4.11 C'. Nota-se na figura 4.11B a presença de bradizoíto no interior do vacúolo, o qual se caracteriza pela alta eletrondensidade das róptrias.

Uma outra alteração morfológica observada nos grupos tratados foi a extrusão citoplasmática através da região posterior do corpo do parasito contendo organelas, como róptrias, mitocôndria e vesículas com conteúdo variado (Fig. 4.12A e A'). Alguns outros parasitos também apresentavam essas mesmas características, sendo que a expansão citoplasmática não continha organelas (Fig. 4.12B-D).

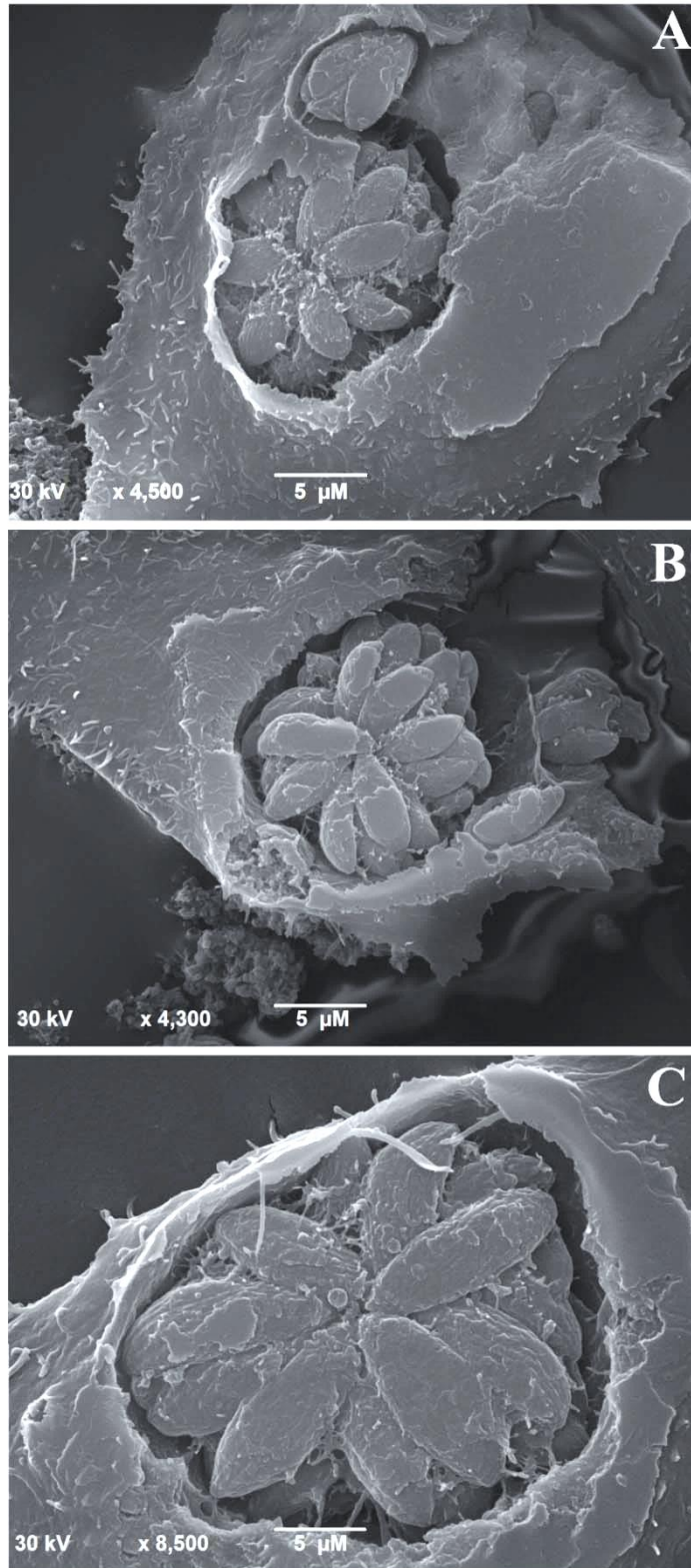


Figura 4.8 A-C. Células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH vistos por MEV, após extração das membranas plasmática e do vacúolo parasitóforo. Na ausência do tratamento observam-se no interior dos vacúolos parasitóforos parasitos organizados em rosetas (A, B e C).

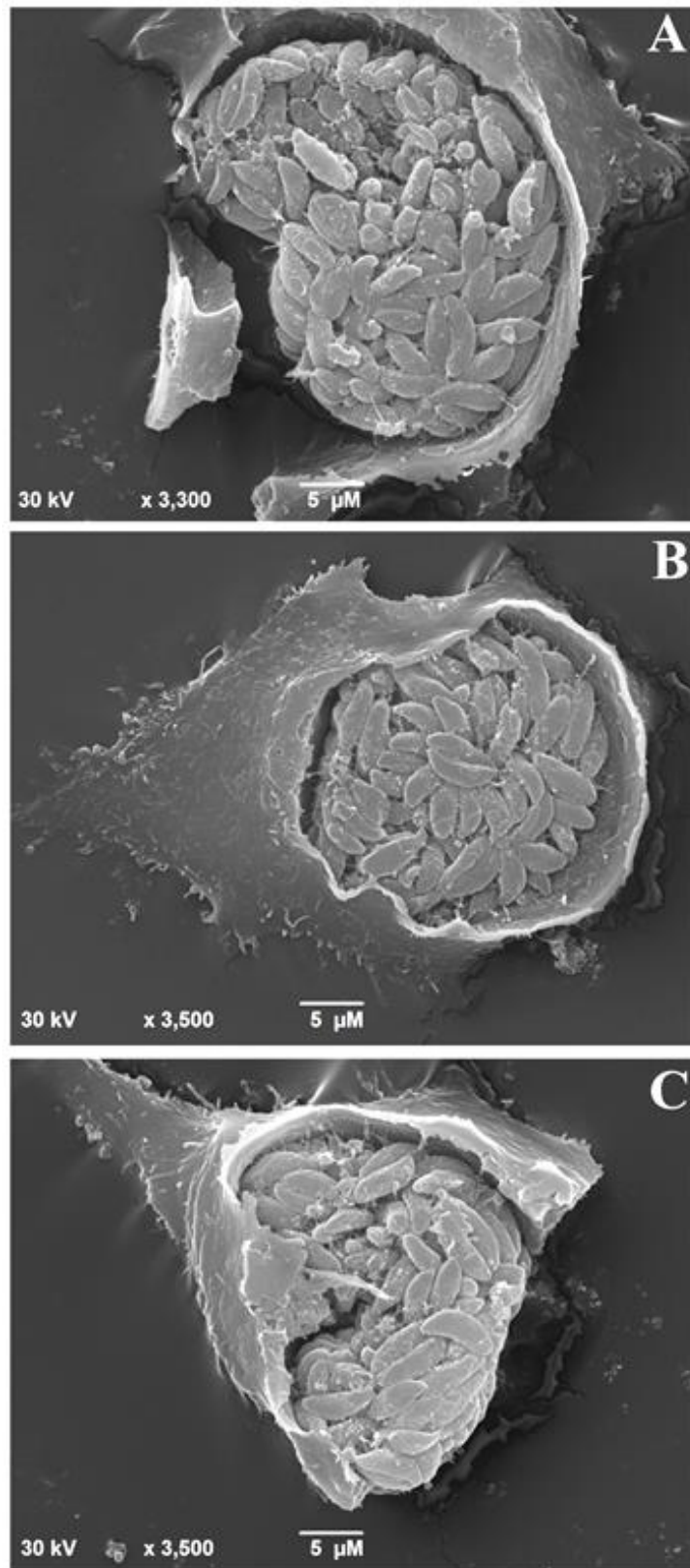


Figura 4.9 A-C. Células infectadas e tratadas com 3-BrPA observadas por MEV com a extração da membrana plasmática da célula hospedeira e do vacúolo parasitóforo. Após tratamento com 10 μM de 3-BrPA, estruturas de grande volume contendo muitos parasitos e a maioria desorganizada, sugestivo da formação de cistos (A-C).

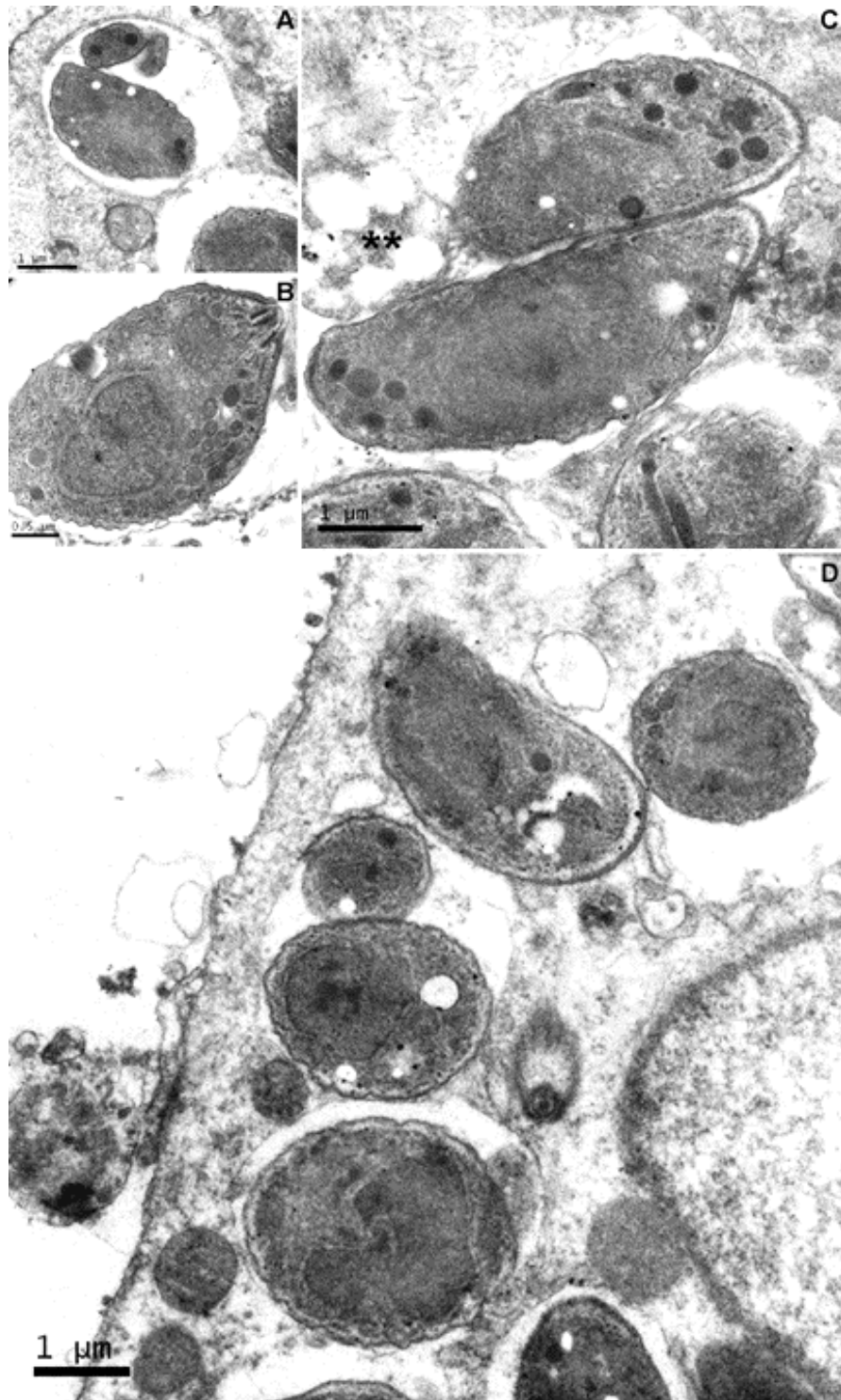


Figura 4.10 A-D. Células LLC-MK₂ infectadas e mantidas por 6 dias e analisadas por MET. Observam-se células contendo parasitos em dupla e boa preservação da membrana do vacúolo (A). Foi possível também notar parasitos que mostravam excelente conservação ultraestrutural (B). Outras células mostravam parasitos intravacuolares e alguns destes parasitos exibiam alterações ultraestruturais (**). (C) Células com número variável de vacúolos contendo 1 a 2 parasitos foram observadas (D).

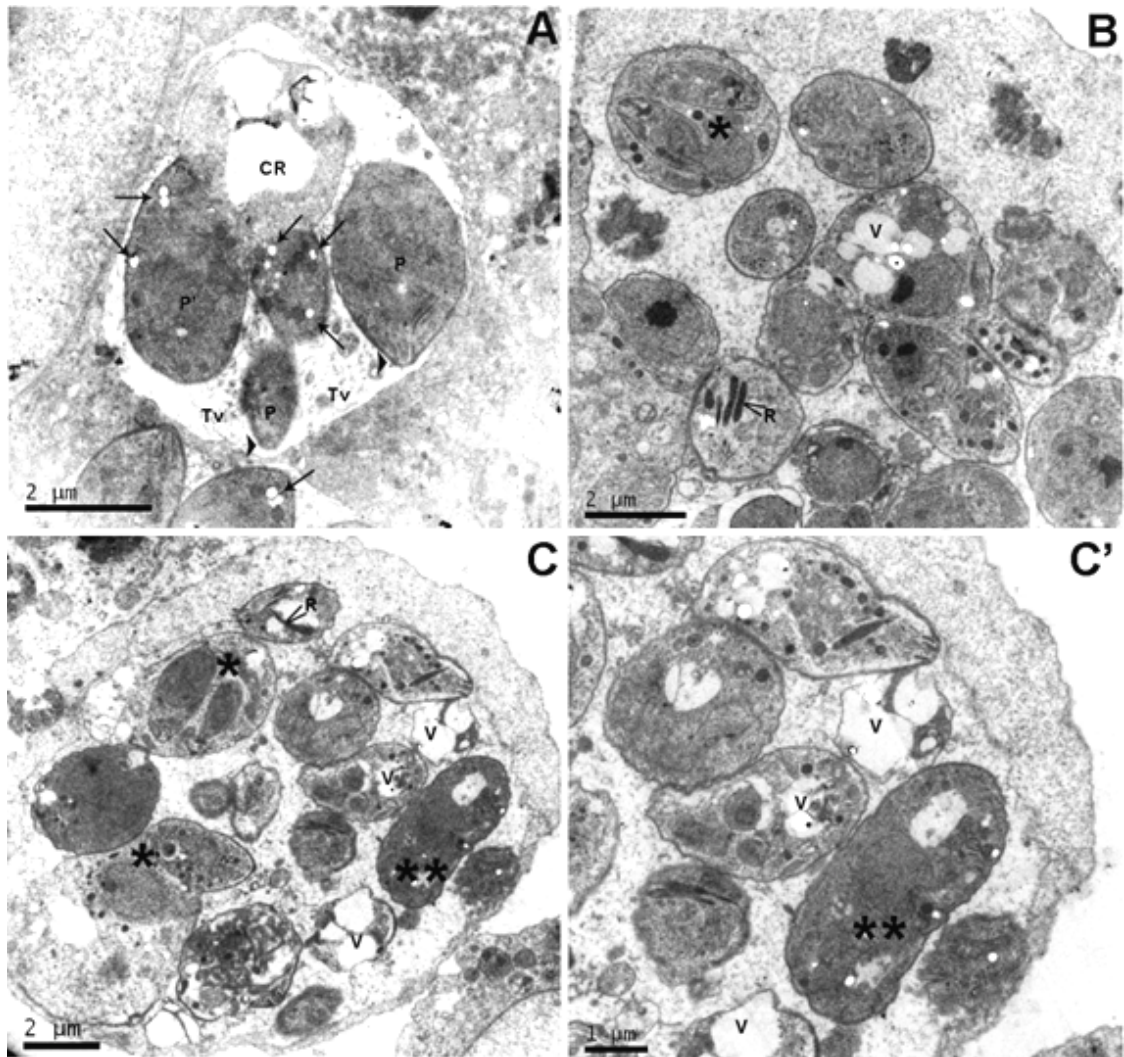


Figura 4.11 A-D. Análise por MET de culturas de células LLC-MK₂ infectadas e mantidas por 6 dias sobre o tratamento com 3-BrPA 10 μ M. Nota-se a presença de vacúolos com parasitos ultraestruturalmente preservados (P) com o complexo apical evidente (cabeça de seta), e parasitos (P') aparentemente associados à um corpo residual volumoso (CR). Observa-se também a presença de grânulos semelhantes aos de amilopectina (seta), e a rede túbulovesicular rarefeita (Tv) (A). Vacúolos parasitóforos com parasitos vacuolizados (v), tumefação celular (**), debris, parasitos sem a forma típica de arco e com divisão celular assíncronica (*), além de parasitos com rôptrias eletrondensas (R) (B, C). Detalhe da figura C em C'.

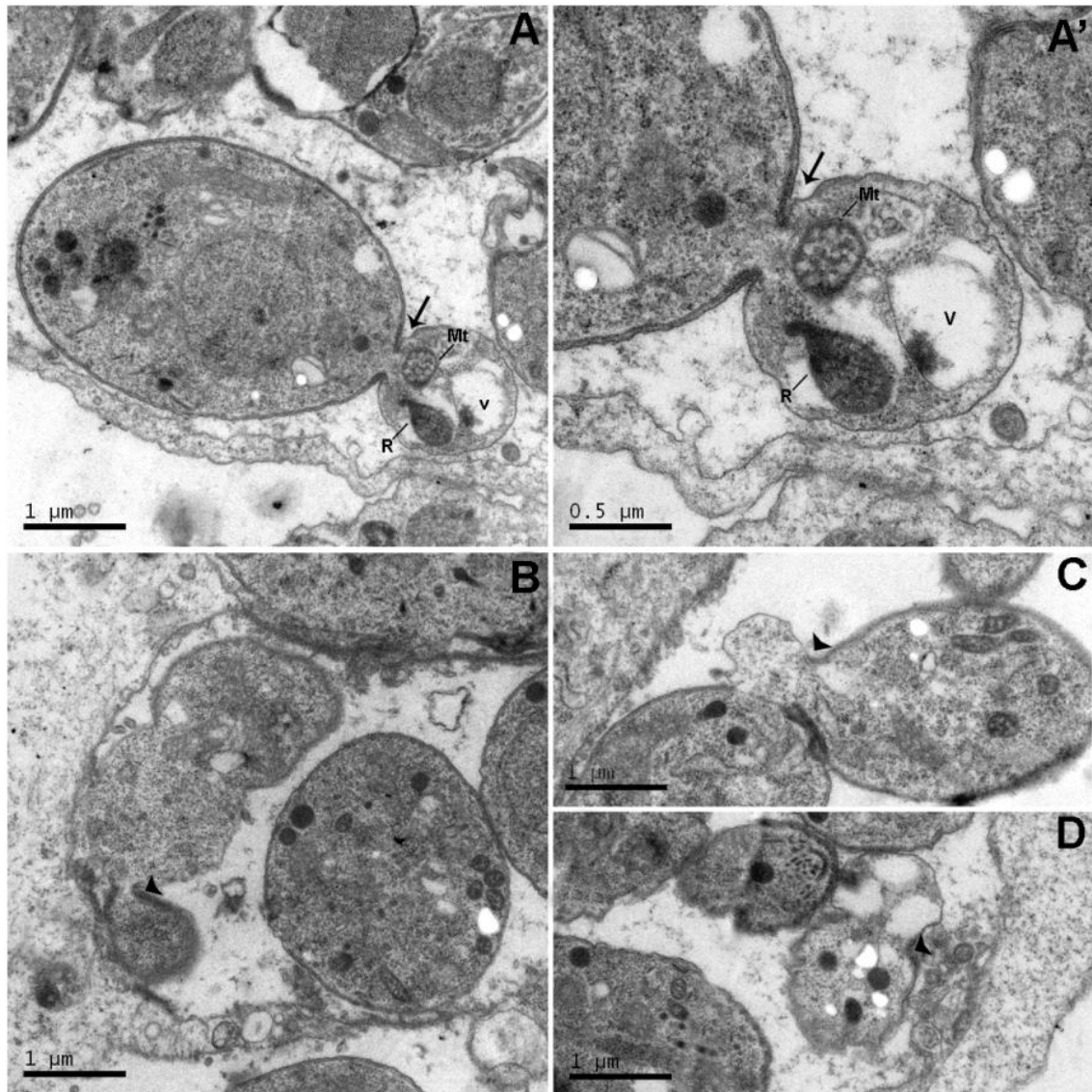


Figura 4.12 A-D. Interação de *T. gondii* com células LLC-MK₂ tratadas com 3-BrPA visualizadas por MET. Observam-se parasitos com extrusão citoplasmática (seta) contendo organelas como róptrias (R), mitocôndria (Mt) e outras vesículas (V) (A e A'). Outros parasitos apresentando o mesmo evento, porém nestas extrusões (cabeça de seta) há ausência de organelas ou vesículas. (B, C e D).

Vacúolos contendo estruturas anômalas foram também observadas principalmente durante o processo de endodiogenia como pode ser visualizado na figura 4.13A, ao lado de parasitos em diferentes estágios de viabilidade, considerando-se a morfologia. Grandes massas, muito provavelmente de origem do corpo residual, contendo dois ou mais núcleos de tamanhos diferentes localizados numa matriz com várias organelas e vesículas (Fig. 4.13A). Ao lado dessas estruturas, parasitos com características morfológicas de bradizoítos são vistos, assim como alguns com sinais morfológicos compatíveis com morte celular (vacuolização, mudança de forma) e outros, em pleno processo de divisão celular por endodiogenia (Fig. 4.13A). A análise do aumento da mesma célula mostra que esse mesmo vacúolo acumula, no corpo residual anômalo, vários perfis de parasitos, sendo que a endodiogenia não foi concluída (Fig. 4.13B). A ausência de sincronismo de divisão celular pode ser observada em vacúolos contendo dois parasitos, sendo que somente um encontra-se em divisão, apesar da desorganização das estruturas celulares, o que denota indícios de comprometimento da viabilidade desses parasitos (Fig. 4.13 C).

Um outro aspecto que merece atenção é a presença de vacúolos contendo parasitos com características morfológicas semelhantes a bradizoítos, principalmente pela presença de grânulos de amilopectina. Associado a isso se observou um acúmulo de material eletrondenso na face interna da membrana do vacúolo parasitóforo, semelhante a construção da parede cística (região granular), como observado nas figuras 4.14A e visto em maior detalhe na figura 4.14B e C.

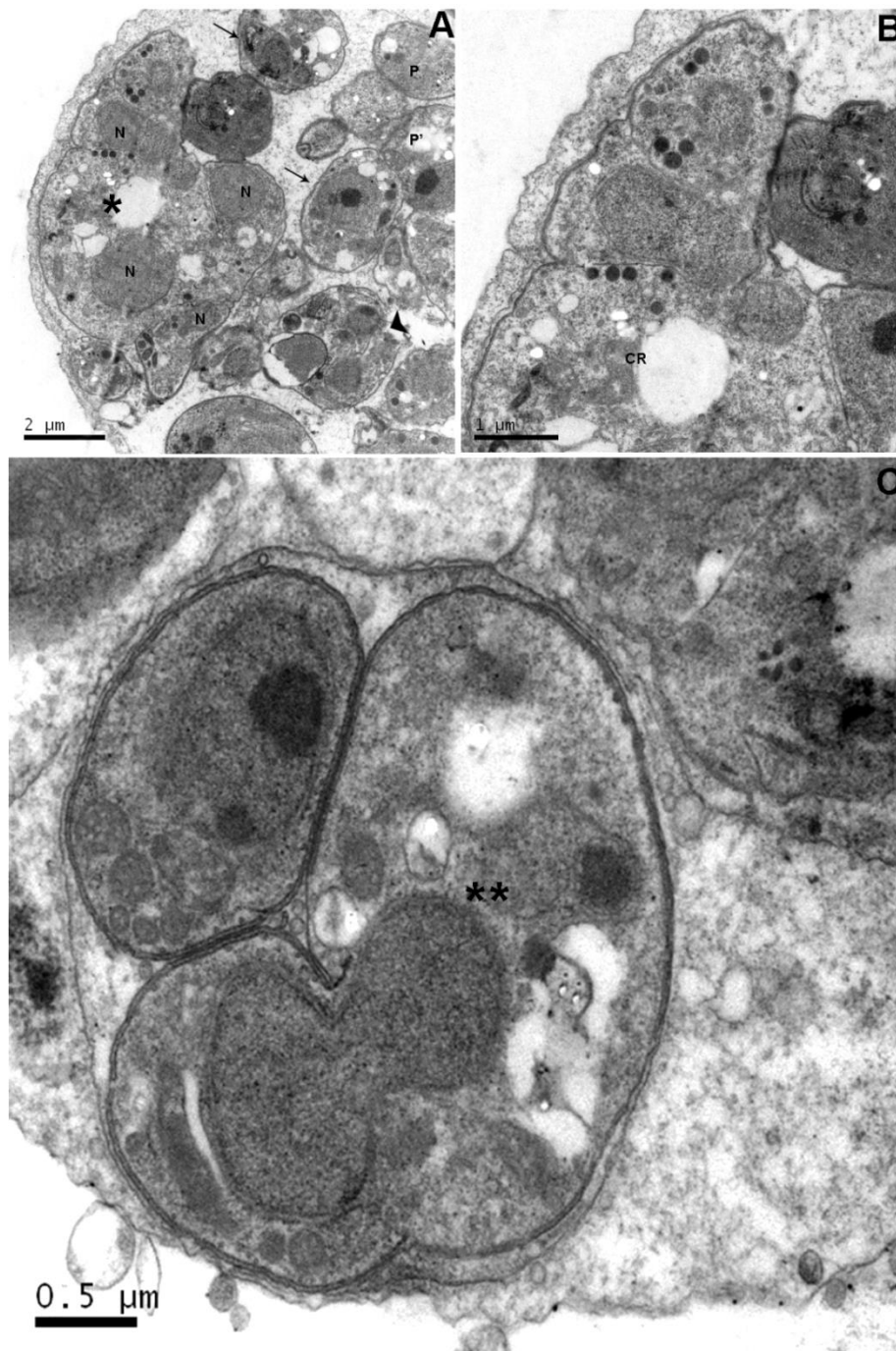


Figura 4.13 A-C. Análise por MET de células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos e tratadas com 3-BrPA durante 6 dias. Nota-se a presença de vacúolos contendo estruturas anômalas(*), com dois ou mais núcleos (N), parasitos degradados (P') e outros viáveis (P). Num mesmo vacúolos e se observou parasitos com sinais morfológicos compatíveis com morte celular (seta) e alguns ainda, em pleno processo de divisão celular (cabeça de seta) (A). Nota-se vacúolo com corpo residual anômalo (CR) (B), a ausência de sincronismo de divisão celular em vacúolos contendo dois parasitos, sendo que somente um encontra-se em divisão (**), apesar de apresentar desorganização das estruturas celulares (C).

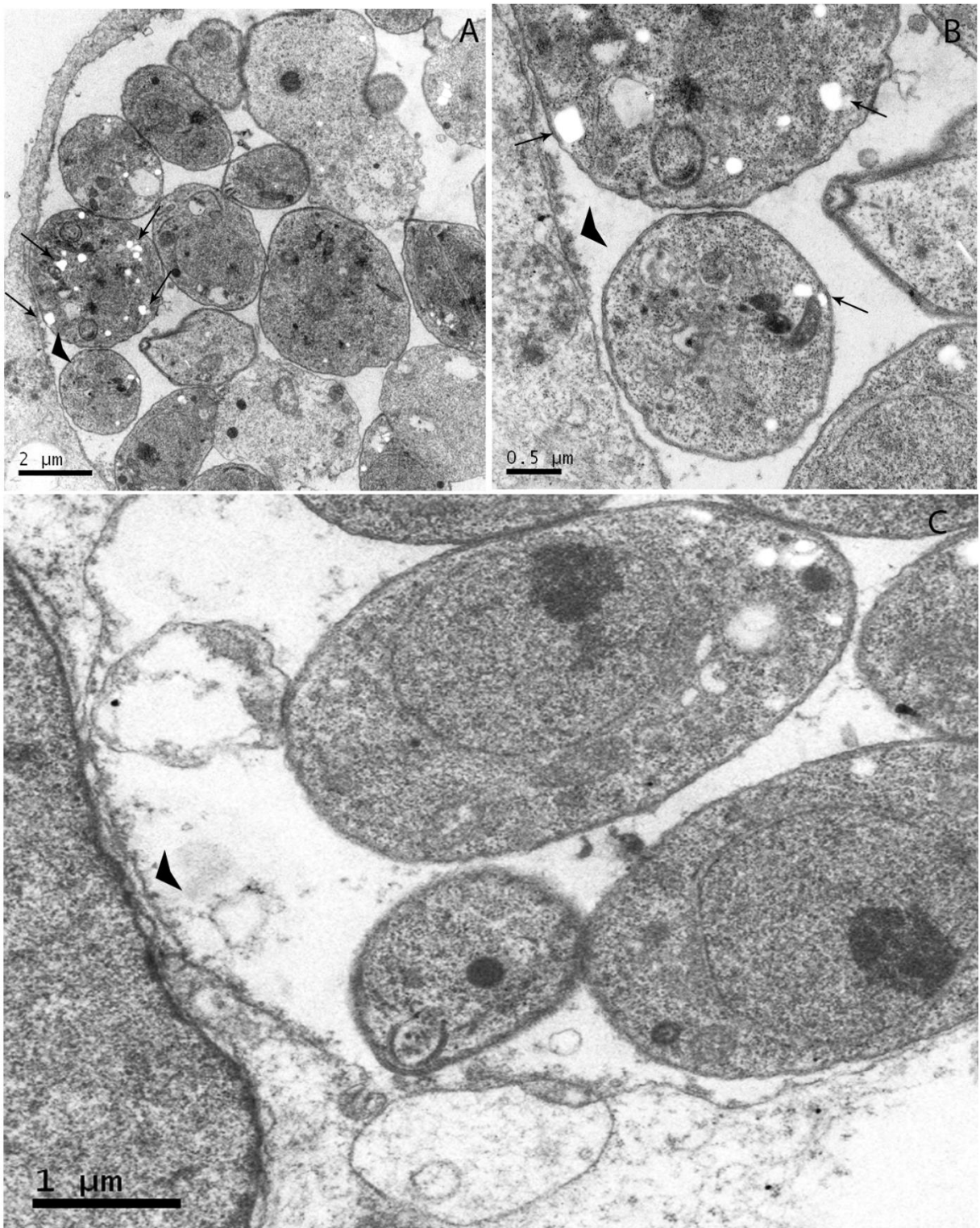


Figura 4.14 A-C. Visualização por MET de culturas de células LLC-MK₂ infectadas e tratadas com 3-BrPA. Observa-se a presença de vacúolos parasitóforos contendo parasitos com grânulos semelhantes aos de amilopectina (seta), associada a um acúmulo de material eletrondenso na face interna da membrana do vacúolo parasitóforo (cabeça de seta) (A, B e C).

4.5. Avaliação por fluorescência das estruturas semelhantes à cistos após tratamento com 3-BrPA

Visando identificar cistos nas culturas durante o tratamento com 3-BrPA, as células infectadas por 6 dias foram processadas para citoquímica, incubando-se as células com a lectina DBA conjugada a FITC. A análise revelou a ausência de marcação nas células controle (Fig. 4.15 A, B) enquanto nas células tratadas com 3-BrPA a marcação com DBA foi positiva (Fig. 4.15 C, D), indicativo da formação de parede cística e o pleno estabelecimento da cistogênese.

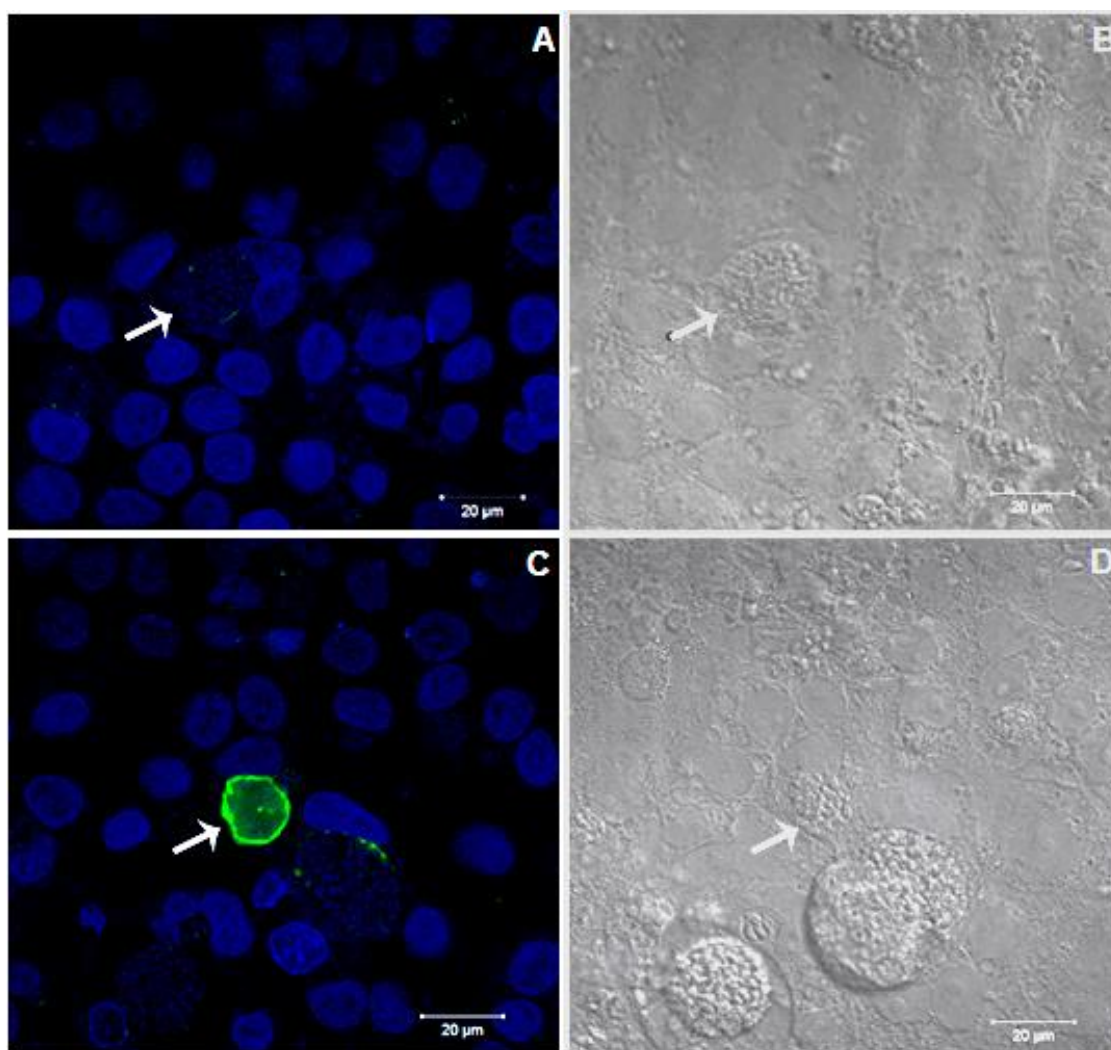


Figura 4.15 A-D. Células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH incubadas com DBA-FITC. Experimento controle, sem tratamento, não apresenta marcação para DBA (A e B). Após tratamento com 3-BrPA 10 µM (C-D) identificamos a parede cística mostrada pela marcação positiva em verde com DBA-FITC (C) e DIC em D. Microscopia de fluorescência, em azul núcleo das células – (A e C). Microscopia interferencial diferencial (DIC) evidenciando os parasitos intracelulares (B e D).

A quantificação dos vacúolos positivos para a marcação com DBA, evidenciou que apenas aproximadamente 25% apresentavam a marcação indicativa de parede cística.

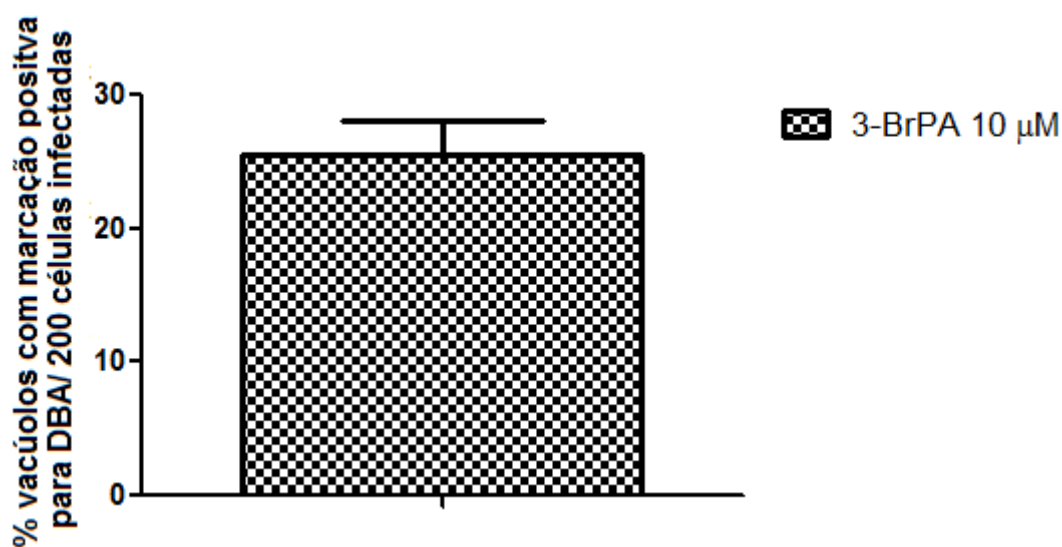


Figura 4.16. Quantificação dos vacúolos positivos com marcação positiva para DBA.

4. 6. Efeito do composto Atovaquona sobre a proliferação de *T. gondii*, cepa RH, em células LLC-MK₂

Culturas infectadas na proporção de 5:1parasito:célula, por 1 h, foram lavadas e deixadas interagir por 24 h e 48 h (grupo controle). Outras culturas, após o período de 1 h de infecção, foram tratadas por 24 h e 48 h com Atovaquona. Os resultados demonstraram que houve menor número de parasitos em concentrações na faixa de nM, com redução de cerca de 51% dos parasitos a partir de 50 nM e o IC₅₀ 49,0 ± 6 nM, após 24 h de tratamento, e após 48 h na mesma concentração, ocorreu redução de cerca de 53% e o IC₅₀ 47,1 ± 3 nM(Fig. 4.17).

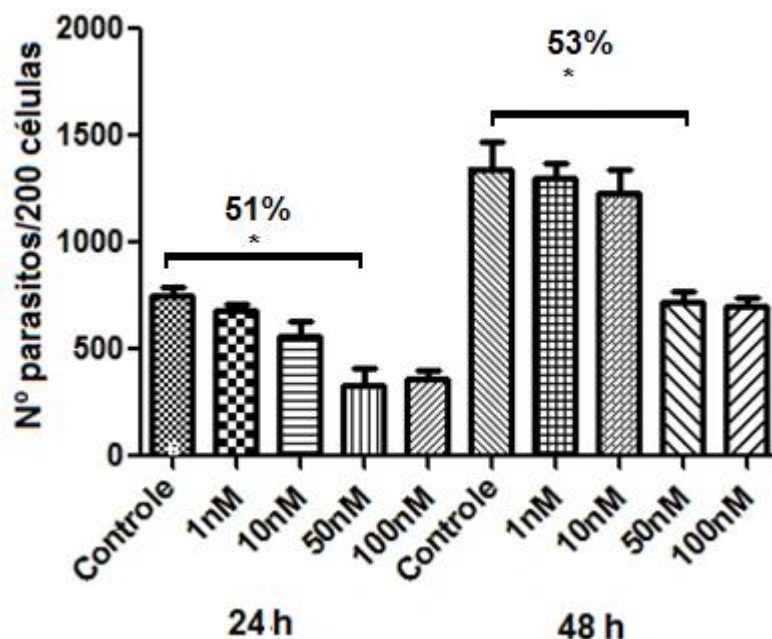


Figura 4.17: Interação de *T. gondii* da cepa RH em células LLC-MK₂ na proporção 5:1 após tratamento com Atovaquona em diferentes concentrações após 24 e 48 h de interação.

* $p \leq 0.05$

A microscopia óptica mostrou nas culturas controle, após 24 h de interação, a presença de vacúolos com diversos parasitos e estes se apresentavam em forma de rosetas (Fig. 4.18A), enquanto as interações mantidas sobre o tratamento com Atovaquona 50 nM, no mesmo período, continham vacúolos com apenas um parasito, evidenciando ausência de divisão celular (Fig. 4.18B).

Nas interações mantidas como controle, após 48 h, notou-se a presença de diversas células infectadas e a maioria delas contendo parasitos dispostos em rosetas (Fig. 19 A). Quando sobre o tratamento com Atovaquona, observou-se poucas células infectadas, porém já apresentando vacúolos com taquizoítos dispostos em rosetas (Fig. 19 B).

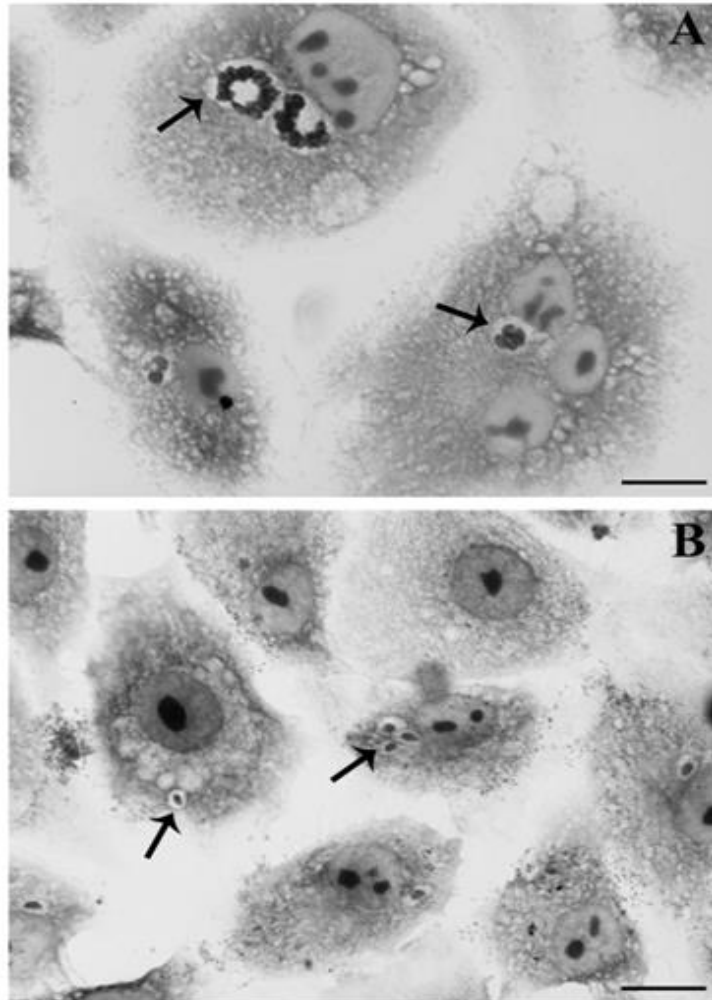


Figura 4.18 A e B. Interação de *T. gondii* da cepa RH em células LLC-MK₂ na proporção 5:1 observada por microscopia óptica. Culturas mantidas na ausência do composto após 24 h de interação. Note o maior número de parasitos por vacúolo (A), em comparação com culturas mantidas sobre o tratamento com Atovaquona 50 nM (B). Barra: 20 μ M.

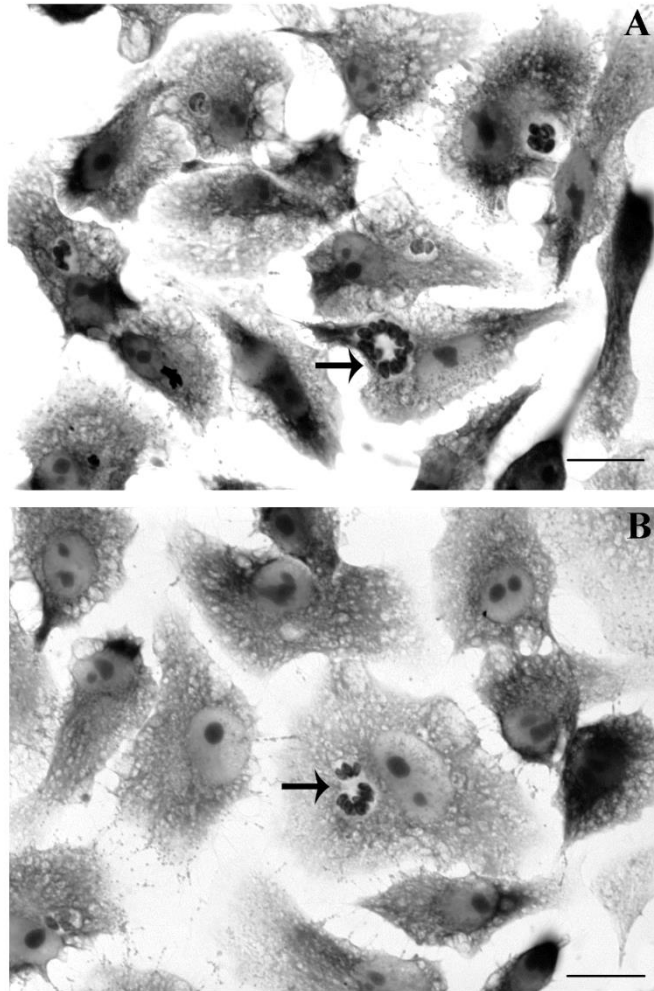


Figura 4.19 A-B. Cultura de LLC-MK₂ durante a interação com *T. gondii*, após 48 h de infecção. Observa-se a disposição dos parasitos nos vacúolos em rosetas e o maior número de parasitos em cada vacúolo (A). Diferentemente, de culturas mantidas em tratamento com Atovaquona 50 nM, em que se nota menor número de células infectadas e de parasitos por vacúolo (B). Barra: 20 μ M.

4.7. Efeito do composto 3-BrPA em associação com Atovaquona sobre a proliferação de *T. gondii*, cepa RH, em células LLC-MK₂

Culturas de células LLC-MK2 infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH, foram observadas durante 24 e 48 h, mantidas ou não na presença de 3-BrPA, Atovaquona ou 3-BrPA em combinação com Atovaquona. Observou-se que após o período de 24 h as culturas mantidas sobre o tratamento combinado de 3-BrPA 10 µM e Atovaquona 50 nM apresentaram maior redução do número de parasitos, o que representou uma inibição com relação ao controle de cerca de 73% (Fig. 4.20 A). Já esta combinação produziu uma redução de cerca de 49% quando comparada com 3-BrPA 10 µM isolada e ainda, comparada com a Atovaquona 50 nM a redução foi em torno de 41% (Fig. 4.20 A).

Quando permitidas interagir com parasitos por 48 h, as culturas tratadas com a combinação de 3-BrPA e Atovaquona mantiveram-se com o menor número de parasitos, apresentaram redução de cerca de 71%, em comparação com o controle. Quando comparadas com 3-BrPA utilizado isoladamente a redução foi em torno de 52%, e em comparação com Atovaquona 45% (Fig. 4.20 B).

Em ambos períodos de tratamento, a combinação de 3-BrPA e Atovaquona obteve efeito aditivo, segundo o cálculo da concentração inibitória fracional (FIC).

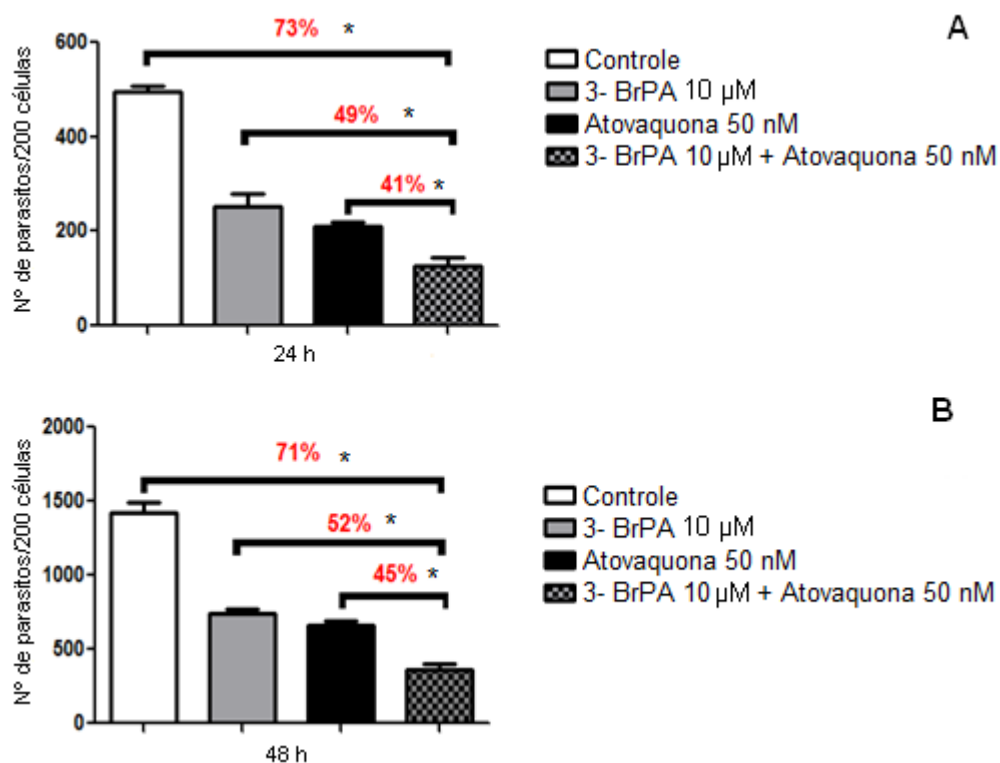


Figura 4.20 A e B. Interação de *T. gondii* da cepa RH em células LLC-MK2 na proporção 5:1 sobos diferentes tratamentos. Culturas mantidas sobre o tratamento com Atovaquona 50 nM, 3-BrPA 10 µM e Atovaquona em associação com 3-BrPA, durante 24 h (A) e 48 h de tratamento (B). * p ≤ 0.05

4.8 Análise da presença de marcação para taquizoítos e cistos teciduais em culturas infectadas e tratadas com 3-BrPA em associação com Atovaquona.

Células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos, da cepa RH, mantidas sem adição dos compostos, após 6 dias de interação, apresentaram marcação positiva para P-30-TRITC evidenciando a presença de taquizoítos na cultura, e marcação negativa para DBA-FITC (Fig. 4.21A-B). Assim como o controle, as interações mantidas sobre o tratamento com 3-BrPA 10 µM e Atovaquona 50 nM, também apresentaram marcação positiva para P-30-TRITC e negativa para DBA-FITC (Fig. 4.21C-D).

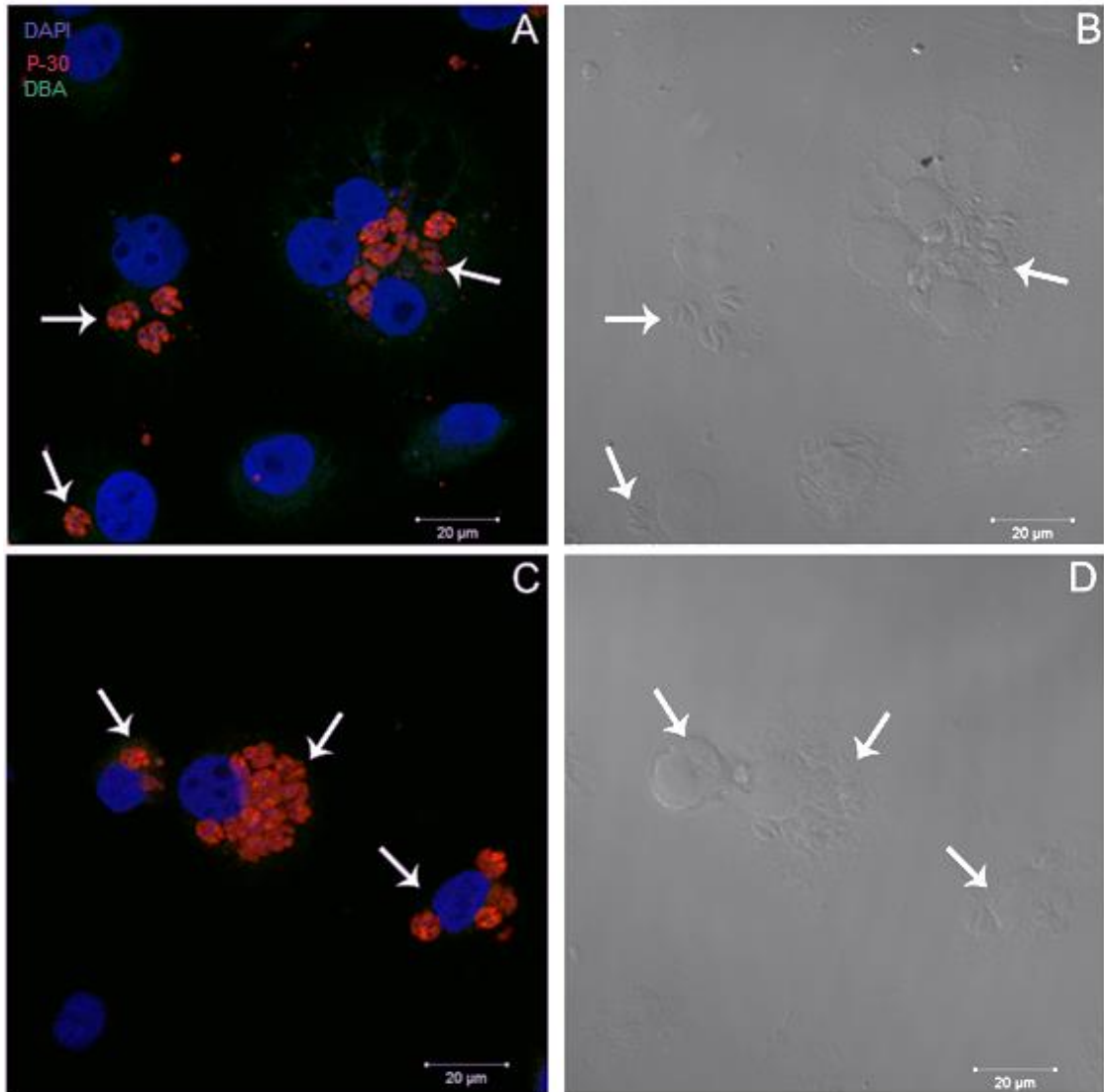
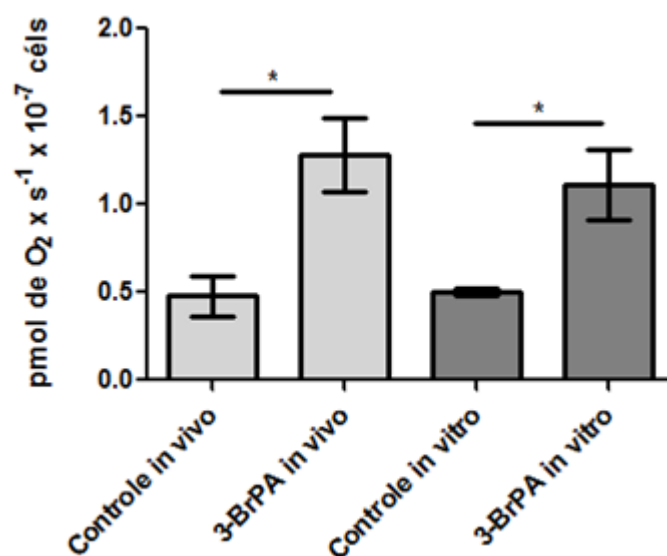


Figura 4.21 A-D. Células LLC-MK₂ infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH e incubadas com anti-P-30 e DBA-FITC, após 6 dias de tratamento com 3-BrPA 10 μM em combinação com Atovaquona 50 nM. Observam-se nas culturas controle (A) e tratadas (C) a marcação do núcleo das células com DAPI (azul), a marcação positiva para taquizoítos com P-30-TRITC (vermelho), e marcação negativa para DBA-FITC (verde-) e o DIC (C e D).

4.9 Análise do consumo de oxigênio de *T. gondii*

Parasitas provenientes de culturas infectadas e tratadas com 3-BrPA 10 μ M e de camundongos também infectados e tratados com o composto, foram analisados e o consumo de oxigênio mensurado em um respirômetro de alta resolução. Os dados obtidos nesta análise evidenciaram que os parasitos tratados tanto *in vitro* como *in vivo* apresentavam maior consumo de oxigênio quando comparado ao controle sem tratamento. Além disso, foi possível observar que o consumo entre os grupos controle *in vivo* e *in vitro* foram iguais, assim como do grupo tratado *in vitro* e *in vivo*.



4.22 Consumo de oxigênio de taquizoítos provenientes de camundongos e células LLC-MK2 mantidas por 6 dias na presença ou ausência de 3-BrPA.

* p ≤ 0.01

5. DISCUSSÃO

O 3-bromopiruvato, um inibidor de metabolismo energético celular possui uma atividade potente antitumoral contra diferentes tipos de câncer (revisto em Pedersen, 2012). Até onde temos conhecimento este é o primeiro estudo que explora a atividade de 3-BrPA sobre o desenvolvimento intracelular de *T. gondii*. O trabalho se estendeu ainda, ao estudo do efeito da Atovaquona e a combinação dos dois compostos sobre a interação de *T. gondii* em células LLC-MK₂, avaliando a proliferação celular e o ciclo intracelular do parasito nestas condições, identificando o 3-BrPA como um composto indutor da cistogênese, *in vitro*.

Para o entendimento da importância deste estudo vale relembrar que o *T. gondii* se diferencia dentro de seus hospedeiros entre taquizoítos/bradizoítos/taquizoítos e que esses estágios infecciosos apresentam características fisiológicas e biológicas distintas. Bradizoítos maduros são adaptados para a persistência ao longo da vida em seus hospedeiros e exibem uma extrema redução na taxa de crescimento, até uma parada completa do ciclo celular (Dubey e cols., 1998) e tem como principal via para obtenção de energia a via glicolítica. Em contraste, os taquizoítos, que estão presentes durante a fase aguda da infecção, são caracterizados por um tempo de duplicação rápido de 6 a 8 h, indicando que esta fase possui vias eficazes para a aquisição de nutrientes e o metabolismo energético (Fleige e cols., 2007), e que utilizam o ciclo do ácido tricarboxílico associado à cadeia respiratória para obtenção de energia (Denton e cols., 1996; Vercesi e cols., 1998).

Uma das abordagens iniciais deste trabalho foi analisar o efeito de 3-BrPA sobre as células da linhagem LLC-MK₂, como hospedeiras do *T. gondii* para o estudo do efeito do composto durante o desenvolvimento intracelular do parasito. Nossos resultados, analisando a proliferação destas células, durante o tratamento, não mostrou qualquer influência de 3-BrPA, tanto no número de células, num período de até 6 dias (aplicando a dosagem máxima do composto empregada na interação parasito-LLC-MK₂) assim como, quanto a viabilidade celular que alcançou 93% neste período. Esses dados eram esperados considerando-se a bem conhecida ação de 3-BrPA como inibidor do metabolismo energético em células tumorais. Em função desta propriedade do composto ele tem sido proposto como um agente

anticâncer específico devido à sua alta seletividade para células tumorais (Nelson, 2002; Geschwind e cols., 2002). Sabe-se também que a energia das células de tumor provém, principalmente, da oxidação da glicose e que existe uma grande diferença do metabolismo de glicose entre células normais e tumorais, visto que a glicólise aumenta muito em células com malignância (Pedersen, 2007).

Em contrapartida, os testes do 3-BrPA durante a interação de taquizoítos e LLC-MK₂, frente a diferentes concentrações, não afetou o percentual de células infectadas, mas foi eficiente no controle da proliferação intracelular dos parasitos, atingindo uma inibição de 42% a partir da concentração de 10 µM durante 24 h de exposição ao composto. O fato de não haver alteração no percentual de células infectadas é indicativo que neste período de análise, o composto não foi capaz de debelar a infecção. Uma alternativa de abordagem utilizada para que essas diferenças pudessem ser melhor avaliadas, foi a alteração da relação parasito-célula hospedeira de 3:1 para 5:1 e com uma única dosagem de 10 µM por períodos de 24 h, 48 h e 6 dias, demonstrando que o efeito do composto foi dose e tempo dependentes. O maior tempo de exposição ao 3-BrPA na concentração de 10 µM levou a uma queda de 15% no percentual de células infectadas apenas após 48 h de interação e de 21% após 6 dias. Com relação à proliferação celular dos parasitos, a redução foi mais efetiva tanto com 24 h quanto com 48 h de interação, atingindo uma inibição de 55% e 61%, respectivamente. A seletividade de ação do 3-BrPA para o *Toxoplasma* refletida na drástica redução no número de parasitos intracelulares, em comparação com a célula de mamíferos, poderia ser explicada pelas evidências bioquímicas diretas de que a cadeia respiratória e fosforilação oxidativa são funcionais nos parasitos Apicomplexas, embora a via respiratória terminal seja diferente do hospedeiro mamífero (Vercesi e cols., 1998).

Em outros protozoários, como *Trypanosoma brucei*, foi descrito que os efeitos inibitórios de 3-BrPA, sobre a motilidade do parasito e o efluxo de piruvato acarretaram na morte do parasito, devido ao bloqueio na enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Barnard e cols., 1993; Vanderheyden e cols., 2000). Tem sido descrito que tal enzima GAPDH exerce papel significativo sobre o fluxo glicolítico de protozoários como *Leishmania mexicana*, *Plasmodium falciparum* e *T. brucei* estabelecendo-se como alvo biológico de valor importante no planejamento de candidatos a novos agentes antiprotozoários (Vellieux e cols., 1993; Kim e cols., 1995; Satchell e cols., 2005). Com isso, ainda são necessários estudos relacionados

à afinidade do composto 3-BrPA à esta enzima e a importância da mesma no fluxo glicolítico do *T. gondii*.

As análises por microscopia de luz das culturas evidenciaram diferenças morfológicas dos parasitos intracelulares que se caracterizavam principalmente pela presença de rosetas nos grupos controles e uma redução do número de parasitos por vacúolo, apresentando prioritariamente, parasitos aos pares nos vacúolos e menor número de células infectadas na presença do 3-BrPA em consonância com a análise quantitativa, mais evidente com 48 h de interação (15% de inibição). Esses dados apontam claramente que o *T. gondii* foi sensível a ação do 3-BrPA. Xiao-Hong e colaboradores (2009) introduziram um aspecto novo aos efeitos da 3-BrPA demonstrando que, pelo menos em células MCF-7 de câncer de mama, o composto inibe a proliferação celular, inibindo as fases S e G2 / M do ciclo celular, promovendo a apoptose nessas células. Nós acumulamos fortes evidências de que o composto foi capaz de interferir no processo de endodiogenia, gerando corpos de grande volume celular contendo várias organelas, multinucleados, desorganizados e com a endodiogenia incompleta (Fig. 4.12). Imagens bastante semelhantes têm sido descritas pelo grupo de Vommaro utilizando o itraconazol sobre *T. gondii* (Martins-Duarte e cols., 2008). Essa observação remete a ideia de que o número de parasitos intracelulares diminui tanto em função da morte celular independente da endodiogenia, como também pelo bloqueio da “citocinese” durante o ciclo da divisão celular, que poderia ser análogo à inibição da proliferação de células de mamíferos desencadeando a apoptose, como proposto por Xiao-Hong e colaboradores (2009).

Um outro aspecto que deve ser discutido é a presença de vários parasitos apresentando a protrusão de grande volume de citoplasma circundado por uma simples membrana plasmática, localizado no polo posterior, contendo ou não organelas citoplasmáticas, indicativo de perturbação da liberação do corpo residual, como produto final da endodiogenia (Fig. 4.11). Imagens similares têm sido descritas após o tratamento de culturas infectadas com *T. gondii* com inibidores de actina, tendo como efeito o bloqueio na reciclagem de algumas organelas da célula mãe, levando à sua acumulação em um corpo residual formado no polo posterior de cada parasito nascente. Em contrapartida, orizalina e taxol causaram a redução drástica na replicação do parasito e resultou no desenvolvimento de grandes massas anormais de parasitos (Shaw e cols., 2000). Imagens semelhantes foram observadas nos nossos experimentos durante a análise ultraestrutural, mas uma

correlação estreita do envolvimento de elementos do citoesqueleto sob o efeito de 3-BrPA, ainda não tem sido descritos. Dessa forma, considerando a sugestão de Xiao-Hong e colaboradores (2009) de que esses processos inibitórios possam ser mediados pela regulação negativa das expressões da proteína Bcl-2, c-Myc e da p53 que são proteínas fortemente associadas à sinalização de morte celular programada, nós estamos inclinados a imputar o efeito inibitório da proliferação celular como o indutor dessas alterações morfológicas e o comprometimento na conclusão da endodiogenia.

Ganapathy-Kanniappan e colaboradores (2010) tem descrito que 3-BrPA induz estresse no retículo endoplasmático (RE), levando à autofagia e apoptose em linhagem de células tumorais humanas HCC. Comparando duas sublinhagens de HCC, os autores mostram que as células SK-Hep1 sofreram a morte celular por apoptose clássica, enquanto as células Hep3B inicialmente responderam com a autofagia protetora, que não impediu a apoptose. É classicamente conhecido que o estresse do RE pode ser desencadeado por várias condições celulares, tais como: esgotamento de energia, o aumento da demanda por síntese de proteínas, o acúmulo de proteínas mal enoveladas, perturbações na homeostase do Ca^{2+} e glicosilação alterada, afetando o ambiente intracelular que levam a adaptação, alarme e apoptose (Xu e cols., 2005). Quando os mecanismos adaptativos não compensam, a morte celular é induzida, principalmente por apoptose, envolvendo tanto a apoptose dependente de caspase e quanto à necrose independente de caspase (Egger e cols., 2003).

Esse conjunto de dados reforça a necessidade de se tecer algumas considerações, em função dos resultados obtidos com as ferramentas empregadas no curso deste estudo. Inicialmente, o bloqueio da proliferação celular teve como indicativos: (i) a redução de parasitos intracelulares por meio da análise quantitativa; (ii) a visualização de baixa presença de rosetas que seria um forte indicativo de processos ativos de endodiogenia; (iii) as imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando claramente que 3-BrPA não afeta todos os parasitos, nem na mesma cultura, nem na mesma célula, nem no mesmo vacúolo (Fig. 4.10). Diferentes estágios morfológicos desde a boa preservação estrutural dos parasitos num mesmo vacúolo, como as características clássicas de morte celular puderam ser observadas. Nós não investigamos, se o composto estimulou a via de morte celular por autofagia ou apoptose, mas essas hipóteses não podem ser

descartadas tendo em vista os diversos artigos que demonstraram a indução dessas vias sob o efeito do 3-BrPA (Egger e cols., 2003; Xu e cols., 2005; Xiao-Hong e cols., 2009; Ganapathy-Kanniappan e cols., 2010).

Um outro aspecto observado durante o monitoramento da infecção, mostrou que 3-BrPA foi capaz de induzir a formação de cistos em culturas infectadas com taquizoítos da cepa RH. Tal constatação foi apoiada: (i) pela presença de vacúolos parasitóforos com grande quantidade de parasitos desorganizados, como observados por microscopia óptica de culturas coradas pelo Giemsa e eletrônica de varredura; (ii) pela revelação da parede cística por meio da incubação das culturas com a lectina DBA, que reconhece e se liga aos resíduos de N-acetilgalactosamina, identificando que o processo da cistogênese tinha se estabelecido em células tratadas com 3-BrPA; (iii) pela presença de grânulos semelhantes aos de amilopectina, presentes em bradizoítos e, (iv) o espessamento da membrana do vacúolo parasitóforo, indicativo de modificação desta membrana para a construção da parede cística. O emprego da linhagem LLC-MK₂ utilizada no presente trabalho tem sido explorada durante a infecção de taquizoítos de diferentes cepas demonstrando que a cepa EGS (cepa brasileira do tipo II) estabelece a cistogênese nessas células espontaneamente, com índices de quase 80% (Parede-Santos e cols., 2013). Em contrapartida, os mesmos autores demonstraram que taquizoítos da cepa RH (tipo I) apresentaram baixa capacidade de conversão (em torno de 4% em 96 h). Esses dados se assemelham aos resultados obtidos com a célula muscular esquelética (conversão em 3% dos vacúolos) sendo que, nesse modelo celular essa conversão já se estabelecia em 18 h de interação (Ferreira-da-Silva e cols., 2009). Dessa forma, nossos resultados mostrando um percentual de 25% de indução da cistogênese induzida pelo 3-BrPA reforça o papel deste composto neste evento celular. Um dos mecanismos conhecidos de ação do 3-BrPA é o bloqueio da via glicolítica em células tumorais (Pedersen, 2012). A evidenciação de que células infectadas tratadas com o composto induziram a cistogênese, sugere que esta via também possa ter sido bloqueada no *T. gondii*. Entender esse processo nos remete a sugerir que a indução da cistogênese pode ter sido desencadeada pelo parasito, como alternativa deste bloqueio, utilizando nutrientes de outras vias metabólicas. Uma das alternativas seria a via do ácido tricarbóxico, presente no parasito, que pode ser iniciada pelo Acetil-CoA proveniente do piruvato formado como produto da glicólise e do Acil-CoA formado na quebra de ácidos graxos, gerando então o ATP.

Sugere-se, portanto, que quando foi bloqueada a via glicolítica pelo composto, o parasito sob estresse metabólico, utilizou esta via alternativa e os genes responsáveis pela modulação da cistogênese foram ativados como demonstrado pela presença da parede cística ao final do tratamento. Confirmar essa hipótese poderia ser um avanço no conhecimento dos processos metabólicos do *T. gondii*.

Parasitas provenientes de culturas infectadas e tratadas com 3-BrPA por 6 dias, e do lavado peritoneal de camundongos infectados e tratados também por 6 dias foram analisados pelo respirômetro de alta resolução. Constatou-se que o consumo de oxigênio destes parasitos era maior em comparação com parasitos mantidos na ausência do tratamento e que esta diferença repetia-se em ambas estratégias experimentais. Desta forma, uma outra hipótese que pode ser formulada frente a esses resultados é que o 3-BrPA bloqueando a via glicolítica, gera estresse no parasito, evidenciado pela alteração no consumo de oxigênio, que poderia induzir à cistogênese.

É importante ressaltar que o consumo de oxigênio foi mensurado com o parasito extracelular. Não se pode excluir a possibilidade de que esse efeito possa ter sido exacerbado ou reduzido considerando-se que se trata de um parasito obrigatoriamente intracelular, cuja vida adaptativa está condicionada ao ambiente do vacúolo parasitóforo e a dependência do metabolismo da célula hospedeira, pois através das proteínas dos grânulos densos, formam-se poros na MVP permitindo a difusão bidirecional de moléculas de até 1.2 kDa, entre o vacúolo e o citoplasma da célula hospedeira (Cesbron-Delauw, 1994; Schwab & cols., 1994). Desta forma, o consumo de oxigênio de parasitos intracelulares e os que estão fora das células poderia ser diferente, mas levando-se em consideração a diferença do consumo de oxigênio encontrada nos parasitos mantidos como controle e os sobre os efeitos de 3-BrPA, é revelado que este composto levou à alterações metabólicas significativas no parasito. Com relação ao tratamento com Atovaquona, os estudos desenvolvidos por outros grupos mostraram que o consumo de oxigênio de taquizoítos da cepa RH mantinha-se menor em comparação ao controle, pelo bloqueio do complexo bc1 na cadeia fosforilativa (Vercesi e cols., 1998; Sale e cols., 2007; Meneceur e cols., 2008).

Neste estudo, os tratamentos com Atovaquona em combinação com 3-BrPA, apresentaram efeito aditivo, ou seja, potencializaram o efeito dos compostos isoladamente, sugerindo que o bloqueio da via glicolítica do parasito por 3-BrPA e

da fosforilação oxidativa por Atovaquona não induziram ao estabelecimento da cistogênese. O presente estudo demonstrou que o uso destes compostos associados foi mais eficiente para eliminar o parasito do que quando utilizados de forma isolada. A análise dos experimentos mostrou que a combinação gerou um menor número de parasitos infectando células e não há indícios de cistogênese. Além disso, não há a eliminação total da infecção. Isto poderia ocorrer devido a existência de outras formas de obtenção de energia pelo parasito, como por exemplo, pelo apicoplasto. Esta organela importante no metabolismo do *T. gondii*, é o local de síntese de ácidos graxos do tipo II, biosíntese de isoprenóides e algumas enzimas do metabolismo de carboidratos (Köhler et al., 1997; Gleeson, 2000; Mazumdar et al., 2006; Fleige et al., 2007). A inclusão dos apicoplastos como rota alternativa da respiração celular do parasito, considera os estudos de Fleige e colaboradores (2007) quando foram localizadas várias enzimas-chave do metabolismo de carboidratos de *T. gondii*, tanto no apicoplasto como no citosol dos parasitos. No citoplasma tem um conjunto completo de enzimas para a glicólise, o que deverá permitir ao parasito metabolizar glicose. Todas as enzimas glicolíticas, do fosfofrutoquinase a piruvato-quinase estão presentes no genoma de *T. gondii*, com múltiplas cópias e isoformas de triose de fosfato isomerase, fosfoglicerato-quinase e piruvato quinase e foram localizadas no apicoplasto. Os níveis de expressão de mRNA de todos os genes com produtos glicolíticos foram comparados entre taquizoítos e bradizoítos, no entanto, um padrão de expressão específico para bradizoíto foi observado apenas para a enolase I. O genoma de *T. gondii* codifica um único complexo piruvato desidrogenase, que foi localizado no apicoplasto e ausente na mitocôndria. A troca de metabólitos entre o citosol e o apicoplasto provavelmente é mediada por um translocador de fosfato que foi localizado no apicoplasto. Desta forma, o conjunto de resultados obtidos na presente dissertação, permite aderir à sugestão de Fleige e colaboradores (2007) quando propõe um modelo que explicaria o suprimento de ATP pelo apicoplasto, assim como a troca de metabólitos entre o citosol e o apicoplasto.

A partir dos dados obtidos neste trabalho, é possível evidenciar que há grandes lacunas sobre o metabolismo do *T. gondii* e a sua importância na cistogênese. Além disso, este trabalho sugere que 3-BrPA pode ser uma importante ferramenta para o estudo da cistogênese *in vitro*, assim como para o estudo do metabolismo do parasito.

6. CONCLUSÕES

O composto 3-BrPA na concentração de 10 μ M com tratamento por 6 dias de células LLC-MK₂ não apresentou efeito sobre a proliferação celular e nem mesmo sobre a viabilidade das células que alcançou 93%. Desta forma, esse modelo celular pode ser empregado no presente estudo, sem intervir no alvo principal, que era o *T. gondii*.

3-BrPA na concentração de 10 μ M reduziu a proliferação intracelular dos parasitos, que pode ser justificado pela interferência na endodiogenia e por morte celular. E como já proposto para células de mamíferos, seu mecanismo de ação seria a inibição das fases S e G2/M do ciclo celular, levando à apoptose.

3-BrPA induz a formação de cistos em culturas infectadas com taquizoítos da cepa RH, como demonstrado pela presença de vacúolos parasitóforos com grande quantidade de parasitos desorganizados, a formação da parede cística como visto pela marcação com DBA, a presença de grânulos semelhantes aos de amilopectina, e o espessamento da membrana do vacúolo parasitóforo.

Os parasitos apresentaram maior consumo de oxigênio após tratamento *in vitro* e *in vivo* com 3-BrPA, evidenciando o efeito do composto sobre o metabolismo do parasito que poderia também induzir à cistogênese.

A análise do efeito de 3-BrPA e Atovaquona *in vitro* mostrou que quando utilizados combinados não há a indução da cistogênese. Esses resultados sugerem que a não eliminação total da infecção pode ocorrer devido a existência de outras formas alternativas para obtenção de energia pelo parasito;

Conclui-se, portanto, que a utilização de 3-BrPA pode se apresentar como uma importante ferramenta para o estudo: (i) da cistogênese *in vitro*; (ii) do metabolismo do parasito, necessitando de maior aprofundamento do alvo de ação do composto em *T. gondii*; (iii) das vias metabólicas alternativas do parasito e, (iv) dos mecanismos moleculares/celulares desencadeados que levaram a morte dos parasitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo FG, Huskinson J, Remington JS. Remarkable *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.*1991; 35:293–299.
- Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic Agent Atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother.*2002; 46:1163-1173.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging. Infect Dis J.* 2003; 9:55–62.
- Barnard JP, Baltazar R, PetLer P. Glucose Catabolism in African Trypanosomes *J Biol Chem.* 1993; 268:3654-3661.
- Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.*2008;6:79-88.
- Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Collier S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2005; 280:34245-34258.
- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 1997; 73:114-23.
- Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 1999; 31:421-428.
- Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem.* 2008; 47:33-45.
- Charron AJ, Sibley LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*.*Traffic.*2004; 5:855-867.
- Cardaci S, Desideri E, Ciriolo M R. Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *J Bioenerg Biomembr.*2012; 44:17–29.

- Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. In: Amato Neto, V., Marchi, C.R. Toxoplasmose. Ed. Atheneu, São Paulo, p.151-181. 1999.
- Coppin A, Dzierszinski F, Legrand S, Mortuaire M, Ferguson D, Tomavo S. Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie*.2003; 85:353-361.
- Craver MP, Knoll LJ. Increased efficiency of homologous recombination in *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 demonstrates that GRA3 is not necessary in cell culture but does contribute to virulence. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;153:149-157.
- Denkers EY, Giazzinelli RT. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinic Microbiol Rev*. 1998; 11:569-588.
- Denton H, Roberts CW, Alexander J, Thong K W, Coombs G H. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett*, 1996; 137:103-108.
- De Souza W, DaMatta RA, Attias M. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:149-154.
- De Souza W, Martins-Duarte E, Lemgruber L, Attias M, Vommaro R C. Structural organization of the tachyzoites of *Toxoplasma gondii*, *Scientia Medica*. 2010; 20: 131-143.
- Diniz EMA, Vaz FAC. Qual é a recomendação atual para o tratamento da toxoplasmose congênita? *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2003; 49:10-10.
- Djurković-Djaković O, Nikolić T, Robert-Gangneux F, Bobić B, Nikolić A. Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:2240-2244.
- Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P E, Moreno SN. Acidocalcisome - Conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*.2005; 3:251-261.

- Dubey JP, Frenkel JK. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol.*1973; 59:505–512.
- 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; 11:267-299.
- Dubey, JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.*..2002; 88:713–717.
- Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, Second edition, CRC Press; 2010; 313.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones J L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitol* 2012; 139:1375–1424.
- Dylag M, Lis P, Niedzwiecka K, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. 3-Bromopyruvate: A novel antifungal agent against the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Biochem Biophys Res Commun.*2013; 434:322–327.
- Dubremetz JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.*2007;9:841-848.
- Egger L, Schneider J, Rheme C, Tapernoux M, Hacki J, Borner C. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ.* 2003; 10:1188-1203.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:133-148.
- Ferreira-da-Silva MF, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho L, Gross U, Lüder CGK, Barbosa HS. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:196-200.
- Fleige T, Fischer K, Ferguson DJ, Gross U, Bohne W. Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the

- single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell*. 2007; 6:984-996.
- Frenkel JK, Dubey JP. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis*. 1972; 126:664–673.
- Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, Cole RN, Syed LH, Rao PP, Ota S, Vali M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res* 2009; 29:4909-4918.
- Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Syed LH, Rao PP, Ota S, Kwak BK, Loffroy R, Vali M. 3-Bromopyruvate induces endoplasmic reticulum stress, overcomes autophagy and causes apoptosis in human HCC cell lines. *Anticancer Res*. 2010; 30:923-935.
- Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res*. 2002; 62:3909–3913.
- Guimarães EV, Carvalho L, Barbosa HS. An Alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98:915-917.
- Hager KM, Striepen B, Tilney LG. The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 1999; 112:2631-2638.
- Harboe A, Erichsen S. Toxoplasmosis in chickens. Attempts to provoke a systemic disease in chickens by infection with a chicken strain and a human strain of toxoplasma. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1954; 35:495-502.
- Hill D E, Chirukandoth S, Dubey J P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 2005; 6:41-61.
- Hu K, Roos DS, Murray JM. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*, 2002; 156:1039-1050.

- Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, DiLullo C, Yates J, Roos D S, Murray J M. Cytoskeletal components of an invasion machine - The Apical complex of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog. 2006; 2.
- Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. EMBO J. 2003; 22:2082-2090.
- Jacot D, Daher W, Soldati-Favre D. *Toxoplasma gondii* myosin F, an essential motor for centrosomes positioning and apicoplast inheritance. EMBO J. 2013; 32:1651-1662.
- Joiner KA, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. Infect Immun. 1993; 61:1169-1172.
- Jones AR, Gillan L e Milmlow D. The anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate on mature boar spermatozoa *in vitro*. Contraception. 1995; 52:317-320.
- Kenney WC. The reaction of N-ethylmaleimide at the active site of succinate dehydrogenase. J Biol Chem. 1995; 270:3089-3094.
- Kessl J J, Lange B B, Merbitz-Zahradnik T, Zwicker K, Hill P, Meunier B, Palsdottir H, Hunte C, Meshnick S, Trumpower B L. Molecular basis for Atovaquone binding to the cytochrome *bc1* complex. J Biol Chem 2003; 278:31312-31318.
- Kim W, Yoon JH, Jeong JM, Cheon GJ, Lee TS, Yang JI. Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. Mol Cancer Ther. 2007; 6:2554-2562.
- Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. Cancer Lett. 2001; 173:83-91.
- Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 324:269-275.

- Kohler S, Delwiche C F, Denny P W, Tilney L G, Webster P, Wilson R J, Roos D S. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 1997; 275:1485-1489.
- Kremer K, Kamin D, Rittweger E, Wilkes J, Flammer H, Mahler S, Heng J, Tonkin CJ, Langsley G, Hell SW, Carruthers VB, Ferguson DJ, Meissner M. An overexpression screen of *Toxoplasma gondii* Rab-GTPases reveals distinct transport routes to the micronemes. *PLoS Pathog*. 2013; 9:1-16.
- Lis P, Zarzycki M, Ko YK, Casal M, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. Transport and cytotoxicity of the anticancer drug 3-bromopyruvate in the yeast *Saccharomyces cerevisia*. *J Bioenerg Biomembr*. 2012; 44:155-161.
- Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected per orally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*. 1999; 21:365-376.
- Lyons RE, Mcleod R, Roberts C.W. *Toxoplasma gondii* tachizoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*. 2002; 18:198-201.
- Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992;15:211-222.
- Maldonado ME; Oh K; Frey PAJ. Studies on *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex. I. Effect of bromopyruvate on the catalytic activities of the complex. *Biol Chem* 1972; 247:2711-2716.
- Martins-Duarte ES, de Souza W, Vommaro RC, Itraconazole affects *Toxoplasma gondii* endodyogeny. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 282:290-298.
- Mcfadden G I. The apicoplast. *Protoplasma*, 2011; 248:641-650.
- Melo EJ, Attias M, De Souza W. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol* 2000; 130:27-33.

- Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V, Garin JF, Derouin F. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1269-1277.
- Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* 2005; 35:829-849.
- Miranda K, De Souza W, Plattner H, Hentschel J, Kawazoe U, Fang J, Moreno S N. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. *Exp Parasitol.* 2008; 118:2-9.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004; 363:1965-1976.
- Moreno SN, Zhong L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem J.* 1996; 313:655-659.
- Moreno SN, Ayong L, Pace DA. Calcium storage and function in Apicomplexan parasites. *Essays Biochem.* 2011;51:97-110.
- Morrisette N S, Murray J M, Roos D S. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 1997; 110:35-42.
- Morrisette N, Sibley LD. Cytoskeleton of Apicomplexa parasites. *Microbiol Mol Biol Ver* 2002; 66:21-38.
- Moura, MA, Amendoeira MRR, Barbosa HS. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:862-864.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat M M. *Immunology of Toxoplasma gondii* 2011 John Wiley & Sons A/S. Immunological Reviews. 281.
- Nam HW. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol.* 2009;47:29-37.

- Nath A, Sinai AP. Cerebral Toxoplasmosis. *Curr Treat Options Neurol*. 2003; 5:3-12.
- Nelson K. 3-Bromopyruvate kills cancer cells in animals. *Lancet Oncol*. 2002; 3:524.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 1908; 147: 763-766.
- Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool*. 1987;34:217-226.
- Nichols BA, Chiappino ML, Pavesio CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*.1994; 80:91-98.
- Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 2008;121:1559-1568.
- Ng P, McCluskey PJ. Treatment of ocular toxoplasmosis. *Aust Prescr* 2002; 25:88-90.
- Paredes-Santos TC, de Souza W, Attias M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol*. 2012;177:420-430.
- Paredes-Santos TC, Martins-Duarte ES, Vitor RW, de Souza W, Attias M, Vommaro RC. Spontaneous cystogenesis *in vitro* of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int*. 2013; 62:181-188.
- Pedersen PL. 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from lab side to bedside: introduction to a special issue. *J Bioenerg Biomembr*. 2012; 44:1-6.
- Pelletier L, Stern CA, Pypaert M, Sheff D, Ngö HM, Roper N, He CY, Hu K, Toomre D, Coppens I, Roos DS, Joiner KA, Warren G. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 2002; 418:548-552.
- Romand S, Della Bruna C, Farinotti R, Derouin F. *In vitro* and *in vivo* effects of rifabutin alone or combined with atovaquone against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2015-2020.

- Satchell JF, Malby RL, Luo CS, Adisa A, Alpyurek AE, Klonis N, Smith BJ, Tilley L, Colman PM. Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallogr D-Biol Crystallogr*. 2005; 61:1213-1221.
- Sarciron ME, Gherardi A. Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis. *Scand J Immunol*. 2000; 52:534-543.
- Shaw MK, Compton HL, Roos DS, Tilney LG. Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 2000; 113:1241-1254.
- Sheffield H G, Melton M L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1968; 54:209-226.
- Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE, Soldati-Favre D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol Microbiol* 2010; 1:1-28.
- Smith DF, Parsons M. *Molecular biology of parasitic protozoa*. Oxford. 1996;55-74.
- Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:32-40.
- Splendore A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. *Rev Soc Sci São Paulo*. 1908; 3:109-112.
- Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res*. 1996; 82:681-686.
- Tanabe K. Visualization of the mitochondria of *Toxoplasma gondii*-infected mouse fibroblasts by the cationic permeant fluorescent dye rhodamine 123. *Experientia*. 1985; 41:101-102.
- Tenter A M, Heckeroth A R, Weiss L M. *Toxoplasma gondii*: from animals to human. *Int J Parasitol*. 2000; 30:1217-1258.

- Tezuka M, Hayashi K, Kubota K, Sekine S, Okada Y, Ina H, Irie T. Growth Rate of locally recurrent hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization: comparing the growth rate of locally recurrent tumor with that of primary hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:783–788.
- Travier L, Mondragon R, Dubremetz JF, Musset K, Mondragon M, Gonzalez S, Cesbron-Delauw MF, Mercier C. Functional domains of the Toxoplasma GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *Int J Parasitol.* 2008;38:757-773.
- Vanderheyden N, Wong J, Docampo R. A pyruvate–proton symport and an H⁺-ATPase regulate the intracellular pH of *Trypanosoma brucei* at different stages of its life cycle. *Biochem. J.* 2000; 346:53-62.
- VanDooren G G, Striepen B. The algal past and parasite present of the apicoplast. *Annu Rev Microbiol* 2013; 67:271-289.
- Vellieux FM, Hajdu J, Verlinde CL, Groendijk H, Read RJ, Greenhough TJ, Campbell JW, Kalk KH, Littlechild JA, Watson HC. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90:2355-2359.
- Vercesi A, Rodrigues CO, Uyemura AS, Zhong L, Moreno SNJ. Respiration and oxidative phosphorylation in the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 1998; 273:31040–31047.
- Waller RF, Mcfadden GI. The apicoplast: a review of the derived plastid of Apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol.* 2005; 7:57-79.
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 2000; 5:391-405.
- Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii* The model Apicomplexan: Perspectives and methods. Elsevier First edition. 2007.
- Weinstein-Oppenheimer CR, Henriquez-Roldan CH, Davis JM, Navolanic PM, Saleh OA, Steelman LS, Franklin RA, Robinson PJ, McMahan M, McCubrey JA. Role of the raf signal transduction cascade in the *in vitro* resistance to the anticancer drug doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:2898–2907.

Xiao-hong L, Xue-fang Z, Yong-li W. Inhibitive effect of 3-bromopyruvic acid on human breast cancer MCF-7 cells involves cell cycle arrest and apoptotic induction. *Chinese Med J.* 2009; 122:1681-1685

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC: Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005; 115:2656-2664.