

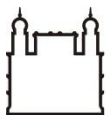
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da
célula muscular esquelética na cistogênese de
*Toxoplasma gondii***

HENRIQUE CARNEIRO DE OLIVEIRA

RIO DE JANEIRO

Maio 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da
célula muscular esquelética na cistogênese de
*Toxoplasma gondii***

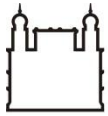
HENRIQUE CARNEIRO DE OLIVEIRA

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

Orientadora: Dr^a. Helene Santos Barbosa

RIO DE JANEIRO

Mai 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HENRIQUE CARNEIRO DE OLIVEIRA

**Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da
célula muscular esquelética na cistogênese de
*Toxoplasma gondii***

Orientadora: Dr^a. Helene Santos Barbosa

Aprovada em: 12/05/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rubem Menna Barreto (IOC/Fiocruz) – Presidente

Prof^a. Dr^a. Márcia Attias (IBCCF/UFRJ)

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Stumbo (IBRAG/UERJ)

Prof^a. Dr^a. Marlene Benchimol (INMETRO) – Suplente/Revisora

Prof. Dr. Daniel Adesse (IOC/Fiocruz) – Suplente

Dedico esta dissertação ao meu Deus, a minha
mãe Maria Ignez Ney Carneiro e a minha esposa
Angélica Benigno Carneiro. Obrigado por todo
amor e paciência.

Agradecimentos

Agradeço a Deus Pai, Filho e Espírito Santo pelo amor, vida, saúde e inteligência. Sem Ele não sou nada!

A minha mãe Maria Ignez, minha esposa Angélica B. Carneiro, meu sogro George Benigno, minha sogra Jacinta Benigno, meu amigo Gilberto (Beto) e meus sobrinhos do coração George Neto e Enzo Leonardo e à família Carneiro... por todo amor, carinho, atenção, respeito, paciência, incentivo, força, inspiração... enfim, tudo!

Aos meus cunhados Cintia Benigno, George Junior, Felipe Benigno, Emerson Barcelos, Adriana Scarpim e Evelyn Galhardo pela força e momentos de descontração.

A minha orientadora Dr^a. Helene Santos Barbosa pelo exemplo de pesquisadora e por todo o conhecimento passado. Pode ter certeza que você influenciou muito a minha maneira de enxergar a carreira científica. A sempre buscar ser mais competente, honesto e dinâmico. Além de me tratar como um amigo. Muito obrigado de coração!

Ao meu amigo Dr. Sérgio H. Seabra pela força que sempre deu para a execução deste e de outros projetos. Obrigado por sempre me incentivar e me colocar para cima!

À Dr^a. Erika Cortez pela prontidão em colaborar no desenvolvimento dos experimentos relacionados à respirometria e ao Dr. Anibal Sanchez pelo acesso ao uso do OROBOROS Oxygraph-2k.

A minha amiga e anjo da guarda nesses dias do mestrado Sandra Maria. Você me ensinou muito mais que técnicas e excelência na execução dos experimentos. Ensinou-me a trabalhar em equipe com primazia. Para onde eu for, levarei comigo as lembranças dos nossos dias de cultura e dos nossos almoços e lanches. Um milhão de beijos! E à amiga Thais pelos socorros nos experimentos, pelos momentos de descontração e incentivos.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Estrutural pelo apoio sem o qual seria impossível chegar até aqui, em especial a MS. Renata Morley de Muno.

Aos doutores e doutoras da banca que se disponibilizaram, em meio as suas correrias, para contribuir com a melhoria considerável deste trabalho.

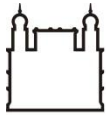
Ao Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Estrutural pela estrutura de ponta.

Ao Programa de Biologia Celular e Molecular pela oportunidade e confiança.

À Capes, ao CNPq, à Faperj e PAPES VI/Fiocruz pelo apoio financeiro.

“Vós sois a luz do mundo;
não se pode esconder uma cidade
edificada sobre um monte; nem se
acende a candeia e se coloca
debaixo do alqueire, mas no
velador, e dá luz a todos que estão
na casa. Assim resplandeça a
vossa luz diante dos homens, para
que vejam as vossas boas obras e
glorifiquem a vosso Pai, que está
nos céus.”

(Senhor Jesus Cristo)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da célula muscular esquelética na cistogênese de *Toxoplasma gondii*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

HENRIQUE CARNEIRO DE OLIVEIRA

T. gondii é parasito intracelular obrigatório, agente etiológico da toxoplasmose, doença com ampla distribuição mundial. Os transtornos mais severos (fase aguda) acometem pacientes imunocomprometidos. Hospedeiros imunologicamente sadios, uma vez infectados, apresentam cistos teciduais (fase crônica) de modo perene. Estudos sugerem que por possuírem um eficiente metabolismo energético, os principais tecidos eleitos para a cistogênese do *T. gondii*, são o nervoso e o muscular esquelético. O presente trabalho dedicou-se ao estudo das associações de mitocôndrias e do retículo endoplasmático (RE) à membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) e à parede cística. Para tanto, foram utilizados bradizoítos e taquizoítos da cepa ME49 (tipo II) e culturas primárias de célula muscular esquelética (CME) e da linhagem C₂C₁₂. Nossas estratégias metodológicas contemplaram microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão, respirometria de alta resolução e ensaios de efeito de um inibidor da fosforilação oxidativa (ISA-34) sobre a cistogênese. Os dados obtidos apontam a ocorrência de: (i) associações entre mitocôndrias com a parede cística; (ii) aspectos peculiares ultraestruturais decorrentes de associações entre mitocôndrias e RE (rugoso e liso) da CME com a MVP de vacúolos contendo bradizoítos; (iii) manutenção do metabolismo mitocondrial da CME pelo *T. gondii*, durante a fase crônica; (iv) efeito inibitório do composto ISA-34 sobre o desenvolvimento de cistos teciduais. Estes resultados, além de iniciarem uma linha de pesquisa inédita a respeito das respostas do metabolismo energético da CME frente à cistogênese de *T. gondii*, também abrem novas perspectivas para uma terapia alternativa voltada para a fase crônica da toxoplasmose.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in skeletal muscle cell
on *Toxoplasma gondii* cystogenesis**

ABSTRACT

**MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR
BIOLOGY**

HENRIQUE CARNEIRO DE OLIVEIRA

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite, agent of toxoplasmosis, disease with a worldwide distribution. The most severe disorders (acute phase) affect immunocompromised patients. Immunologically healthy individuals, once infected, develop tissue cysts (chronic phase) that can persist for the host life span. Studies suggest that an efficient energetic metabolism, as in nervous and skeletal muscle tissues, leads to the development of *T. gondii* cystogenesis. The present work aims the study of the association of skeletal muscle cell (SkMC) mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) to the parasitophorous vacuole membrane (PVM) and to the cyst wall (CW). Bradyzoites and tachyzoites from ME49 strain (type II) of *T. gondii* and SkMC cultures and C2C12 cell line were used. The methodological strategies employed were fluorescence microscopy, transmission electron microscopy, high-resolution respirometry and assay using ISA-34, an inhibitor of oxidative phosphorylation. Our data point out: (i) associations between mitochondria and CW; (ii) ultrastructural aspects of the association of SkMC mitochondria and ER (rough and smooth) with PVM of bradyzoite-containing vacuoles; (iii) maintenance of SkMC mitochondrial metabolism by *T. gondii* and, (iv) inhibitory effect of ISA-34 on the tissue cysts development. These results stimulate further investigation concerning the response of SkMC energy metabolism during cystogenesis of *T. gondii* and also open novel perspectives for an alternative therapy against toxoplasmosis chronic phase.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – *Adenosine Tri Phosphate*

CME - Células Musculares Esqueléticas

CoQ – Coenzima Q

DBA – *Dolichus biflorus agglutinin*

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA - Ácido etileno diamino tetra-acético, do inglês *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV - Vírus da imunodeficiência humana, do inglês *Human Immuno deficiency Virus immuno deficiency syndrome*

INF- γ - Interferon gama, do inglês *Interferon-gamma*

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MVP- Membrana do Vacúolo Parasitóforo

MVP-PC – Membrana do Vacúolo Parasitóforo em modificação para Parede Cística

PBS – Salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PFA – Paraformaldeído

RE – Retículo Endoplasmático

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

REL – Retículo Endoplasmático Liso

RIV – Rede Intravacuolar

SFB - Soro Fetal Bovino

STE – Sistema Transportador de Elétrons

VP – Vacúolo Parasitóforo

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Aspectos históricos	1
1.1.2 Estágios infectivos e cepas.....	1
1.1.3 Ciclo biológico	5
1.2 Toxoplasmose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento	7
1.2.1 Epidemiologia	7
1.2.2 Diagnóstico	9
1.2.3 Tratamento	9
1.3 Célula muscular esquelética (CME) e linhagem C2C12	11
1.4 Interação parasito-célula hospedeira	13
1.5 Mitocôndrias	17
1.6 Associação de organelas da célula hospedeira com a membrana do vacúolo parasitóforo de <i>T. gondii</i>	21
JUSTIFICATIVA.....	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos/metas	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Cultura primária de células musculares esqueléticas	26
3.2 Manutenção da linhagem de células musculares esqueléticas C2C12.....	27

3.3 Obtenção dos parasitos	27
3.3.1 Bradizoítos	27
3.3.2 Taquizoítos	28
3.4 Interação parasito-célula hospedeira	29
3.5 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão.....	29
3.6 Técnicas para visualização de mitocôndrias e cistos por microscopia de fluorescência	29
3.7 Respirometria de alta resolução das culturas infectadas	30
3.8 Ensaio do efeito de composto ISA-34 sobre a interação <i>T. gondii</i> -C2C12	30
4. RESULTADOS	32
4.1 Funcionalidade mitocondrial da célula muscular esquelética infectada com bradizoítos da cepa ME49 em diferentes períodos de interação.....	32
4.2 Interação ultraestrutural de organelas da célula muscular esquelética com a membrana do vacúolo parasitóforo de bradizoítos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	35
4.3 Análise da taxa respiratória basal e do acoplamento das mitocôndrias da célula muscular esquelética durante a cistogênese de <i>T. gondii</i>	68
4.4 Efeito do composto ISA-34 sobre a cistogênese de <i>T. gondii</i>	71
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1. Aspectos históricos

Parasito intracelular obrigatório e agente etiológico da toxoplasmose, *Toxoplasma gondii* foi apresentado pela primeira vez à comunidade científica em 1908 (Nicolle e Manceaux, 1908, 1909; Splendore, 1908). Desde a sua descoberta no roedor *Ctenodactylus gundi*, a transmissão deste parasito fora sempre um mistério. O roedor era encontrado em montanhas da Tunísia e utilizado em pesquisas de leishmaniose no Instituto Pasteur de Tunis. Por encontrar o parasito coccídeo nas amostras de sangue do roedor em experimentação, Chatton e Blanc (1917) suspeitaram que o *T. gondii* não havia sido transmitido naturalmente, mas em cativeiro por artrópodes circulantes nos laboratórios da Instituição. A partir daí, em associação com outros pesquisadores norte-americanos (Woke e cols., 1953), Chatton e Blanc fizeram inúmeros estudos de transmissão do *T. gondii* abrangendo uma gama grande de artrópodes. Contudo, seus resultados foram negativos. Até o ano de 1970, apenas os estágios assexuados do *T. gondii* eram conhecidos (taquizoítos ou trofozoítos, bradizoítos ou cistozoítos). Seu ciclo sexual e o estágio ambientalmente resistente, o oocisto, foram descobertos por Frenkel (1970), o que trouxeram um grande impacto no entendimento e no controle da doença (Dubey, 2009).

1.1.2. Estágios infectivos e cepas de *T. gondii*

O *T. gondii* pode se apresentar sob três estágios infectivos, com formato arqueado, ao longo de seu ciclo de vida: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Fig.1.1).

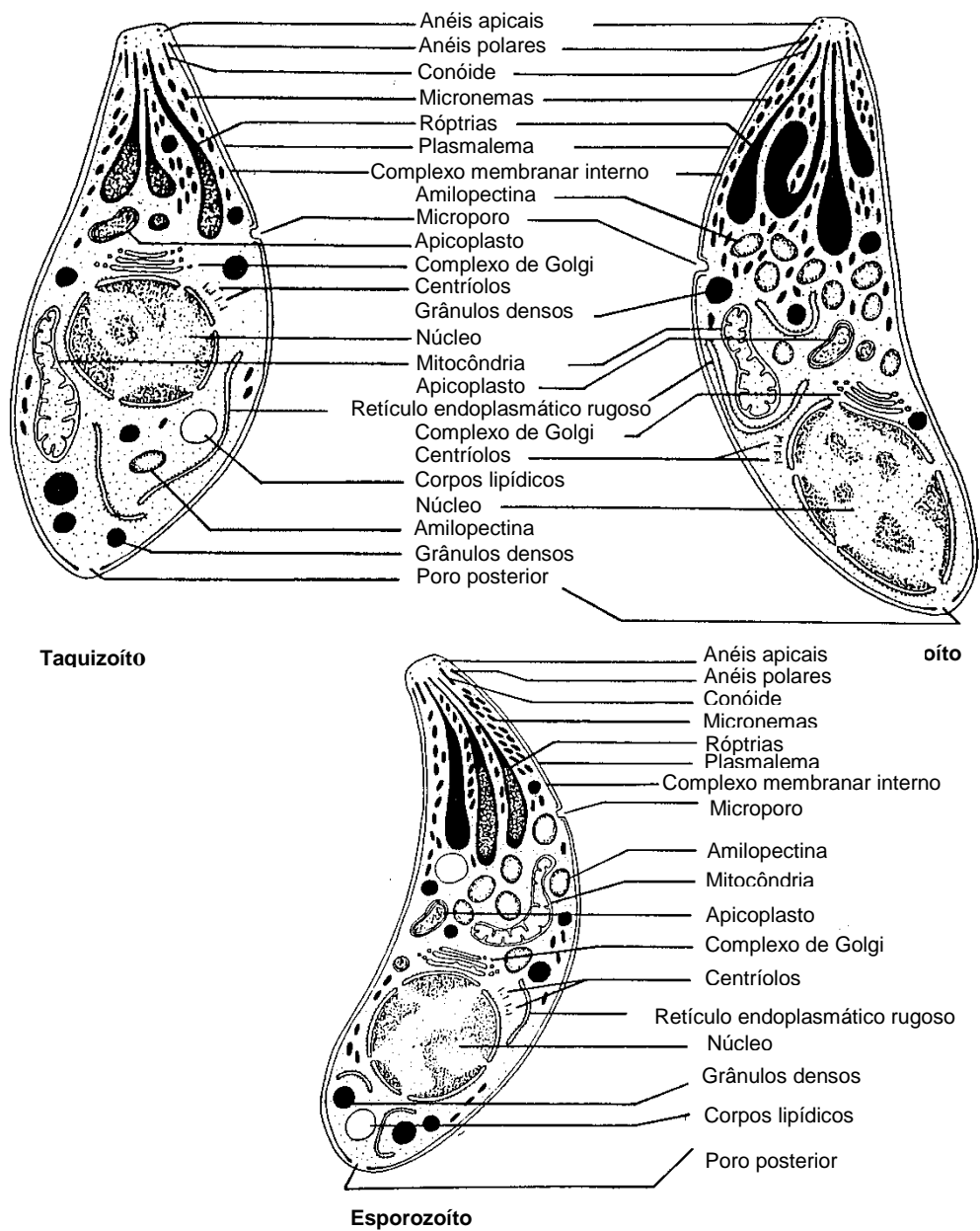


Figura 1.1: Ultraestrutura das formas infectivas de *T. gondii*. Adaptado de Dubey e cols.(1998). Diferenças entre as formas infectivas se destacam principalmente quanto à posição do núcleo, quantidade de grânulos de amilopectina e micronemas e morfologia das róptrias.

Os taquizoítos são assim chamados por proliferarem rapidamente (*tachos*, em grego significa rápido) e representam o estágio característico da infecção aguda. Em seu formato em arco, a análise ultraestrutural mostra a região anterior (onde se encontra o conóide) mais pontiaguda em comparação a posterior, que é mais arredondada. Apresentam-se com comprimento em torno de 6 μm e largura de 2 μm . Reproduzem-se assexuadamente dentro do vacúolo parasitóforo, no interior da célula hospedeira, por endodiogenia (uma forma peculiar de reprodução, na qual

duas células-filhas são geradas dentro da célula-mãe, que degenera ao final do processo).

Os bradizoítos, por sua vez, possuem esta nomenclatura, pois se multiplicam (também por endodiogenia) de modo mais lento (*bradi*, em grego significa devagar). Apresentam-se com cerca de 7 µm de comprimento e 1,5 µm de largura. A organização ultraestrutural dos bradizoítos, que os distingue dos taquizoítos e esporozoítos, é a localização do núcleo na região posterior do parasito, presença abundante de grânulos de amilopectina e micronemas e, ainda, róptrias mais eletrondensas. Uma particularidade dos bradizoítos é que representam o estágio predominante na fase crônica da infecção. Sua multiplicação lenta ocorre, inicialmente, no interior do vacúolo parasitóforo e, posteriormente, após modificação da membrana do vacúolo parasitóforo, forma a parede cística, constituindo assim, o cisto tecidual. O cisto é uma estrutura resistente que pode ser encontrado em vários tecidos do hospedeiro (Fig. 1.2). Apesar desta ampla distribuição dos cistos teciduais por todo o corpo do hospedeiro, a literatura registra uma maior quantidade destas estruturas nos tecidos musculares esqueléticos e nervoso. Uma vez formado, o cisto tecidual protege os parasitos contra a resposta imune do hospedeiro e contra eventuais intervenções farmacológicas. Por este motivo, podemos observar, em muitos casos, que a toxoplasmose configura uma infecção que pode perdurar por toda a vida do hospedeiro (Dubey e cols., 1998).

Existem ainda diferenças cruciais entre taquizoítos e bradizoítos no que tange a algumas vias metabólicas importantes para a obtenção de energia. Os taquizoítos apresentam funcionalidade na via glicolítica, ciclo dos ácidos tricarbóxicos e cadeia respiratória, enquanto bradizoítos apresentam apenas a via glicolítica (Vercesi e cols., 1998). Além disso, incubações *in vitro* de taquizoítos com alguns inibidores mitocondriais, tais como, rotenona, antimicina e carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) induziram o aparecimento de marcadores específicos de bradizoítos (Tomavo e Broothroyd, 1995).

Por último, os esporozoítos podem ser encontrados em oocistos presentes nas fezes de felinos, os quais são os hospedeiros definitivos no ciclo de vida do *T. gondii*. Esporozoítos, em termos de ultraestrutura, apresentam grande número de micronemas, róptrias mistas (aspecto de esponja e eletrondensas), poucos grânulos

de amilopectina (que também são peculiaridades dos bradizoítos). Medem aproximadamente 2 μm de largura e 6-8 μm de comprimento (Dubey e cols., 1998; Wang e cols., 2012).

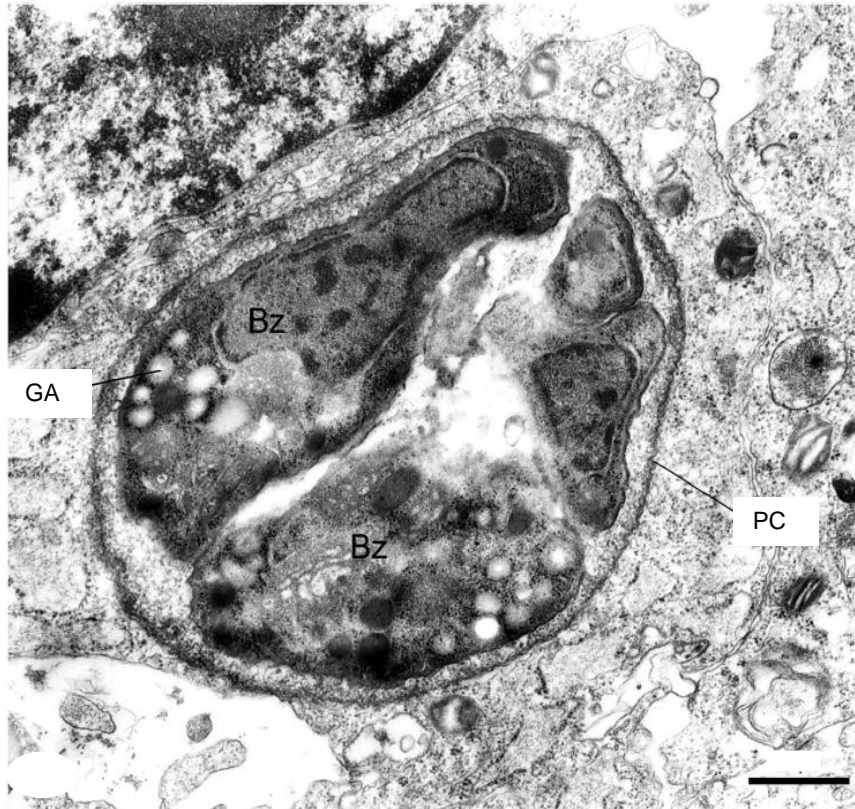


Figura 1.2: Cisto tecidual de *T. gondii*. Célula muscular esquelética infectada por bradizoítos (Bz) contidos no interior de um cisto tecidual. Grânulos de amilopectina (GA) e parede cística (PC). Guimarães e cols. (2008). Barra: 500 nm

A literatura classifica as cepas de *T. gondii* com base nos genótipos e na bioquímica dos isolados de animais e humanos. Mesmo com uma ampla variedade de tipos de células hospedeiras e uma vasta distribuição mundial, o *T. gondii* apresenta baixa variabilidade genética. Assim, foram agrupados em três tipos: cepa tipo I, como a cepa RH e as cepas tipo II e III, Prugniaud e ME-49 (II) e como a C56, 76K (III) (Dubey e cols., 1997). Os parasitos do tipo I são altamente virulentos no modelo camundongo da linhagem *Swiss Webster* com aproximadamente 16 g. Essas cepas estão geralmente associadas com a toxoplasmose congênita (25%) e

são mais encontradas parasitando animais. Cepas do tipo II representam mais de 70% dos isolados humanos. Em sistemas *in vitro*, essas cepas diferenciam-se da forma taquizoíta parabradozoíta em altos índices e, portanto, são associadas com uma alta carga cística e com a fase crônica da infecção. As cepas do tipo III representam em torno de 45% dos parasitos isolados de animais, sendo pouco frequentes em isolados de humanos apresentando sintomas (Weiss e Kim, 2000; Hunter e Sibley, 2012).

1.1.3. Ciclo biológico

O ciclo de vida de *T. gondii* na natureza é um dos mais complexos dentre os parasitos humanos (Fig. 1.3). Este possui duas fases: uma assexuada e outra sexuada. A fase assexuada ocorre em todos os tipos de células nucleadas, tanto nos hospedeiros definitivos quanto nos intermediários, enquanto a fase sexuada é restrita aos felídeos, seus hospedeiros definitivos (Dubey e cols., 1998).

As principais portas de entrada do *T. gondii* nos seus hospedeiros, atualmente descritas são: a) pela ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou malcozidas de animais contaminados; b) pela ingestão de oocistos presentes em águas que tenham entrado em contato com fezes de felinos contaminados ou tenham sido contaminados diretamente com oocistos; c) pelo consumo de vegetais e hortaliças irrigadas por águas contaminadas e, d) pela via transplacentária, na qual taquizoítos presentes no sangue da mãe infectam o feto em desenvolvimento, através da placenta. Outras vias de transmissão englobam transfusão de sangue e transplante de órgãos (revisado em Hill e Dubey, 2002).

Uma vez que os cistos teciduais e oocistos são ingeridos, a parede de cisto e de oocistos é digerida pelas enzimas do trato gástrico e intestinal, o que ocasiona a liberação de bradizoítos e esporozoítos, respectivamente. Esses parasitos, então, invadem as células da mucosa do tubo digestório e no interior destas células, alguns destes bradizoítos podem se replicar lentamente e outros podem se diferenciar em taquizoítos. Esses taquizoítos seguem por duas vias: (a) do ciclo lítico, quando proliferaram em altas taxas, até que as células hospedeiras estejam repletas de parasitos e culminem com o seu egresso, liberando os parasitos

que infectarão células vizinhas até alcançarem a corrente sanguínea, disseminando a infecção por todo o corpo do hospedeiro; (b) da cistogênese, estes taquizoítos que se originaram a partir de bradizoítos, podem, após uma série de multiplicações, se rediferenciar em bradizoítos e formarem cistos teciduais em um período de 5 a 12 dias após a infecção (Dubey e cols., 1998).

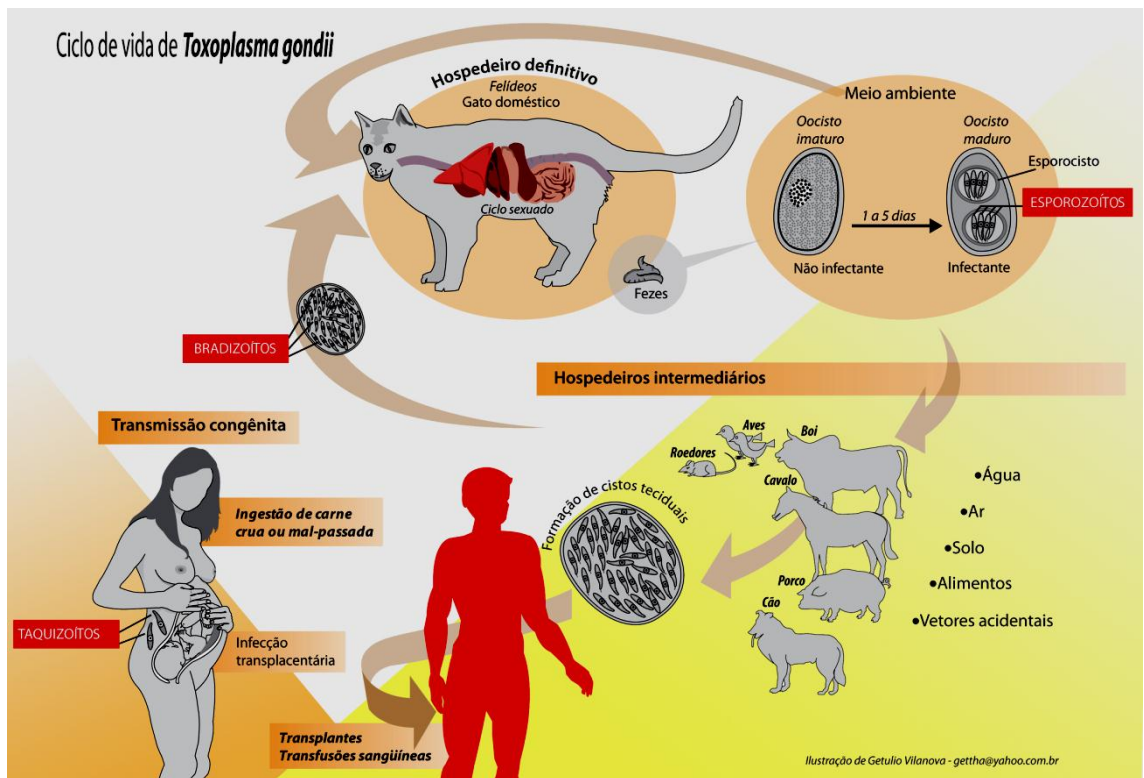


Figura 1.3: Ciclo biológico de *T. gondii*. A ilustração mostra as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários, representados pelas aves e mamíferos incluindo o homem e os hospedeiros definitivos, os felídeos. O ciclo compreende duas fases de reprodução: sexuada e assexuada. Moura e cols. (2009).

A fase sexuada por sua vez, ocorre estritamente em felídeos. Bradizoítos e esporozoítos, oriundos dos cistos, e oocistos rompidos no estômago do animal, penetram nas células epiteliais da superfície intestinal (enterócitos), onde ocorre a formação de diferentes esquizontes, por reprodução assexuada, até a formação de gametas femininos e masculinos (Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009). Após a fecundação, forma-se o zigoto que será envolto por uma parede e passa ser chamado de oocisto. Quando estes oocistos estão ainda imaturos, são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes dos felídeos. No ambiente, estes

oocistos esporulam e se tornam infectantes. Cada oocisto maduro, na sua forma infectiva, contém 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada que, ingerido pelos animais, incluindo o homem, fecha o ciclo de vida deste parasito (revisto em Ferguson, 2009).

1.2. Toxoplasmose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento

1.2.1 Epidemiologia

A toxoplasmose é considerada atualmente a zoonose mais cosmopolita de todas, prevalecendo com *hot spots* de até 75% em muitas áreas do mundo (Fig. 1.4). Tem importância veterinária e médica por causar abortos e gerar doença congênita em várias espécies de hospedeiros intermediários, incluindo no homem. A epidemiologia do parasitismo por *T. gondii* é demasiada complexa e, portanto, não está ainda totalmente esclarecida (Pappas e cols., 2009; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

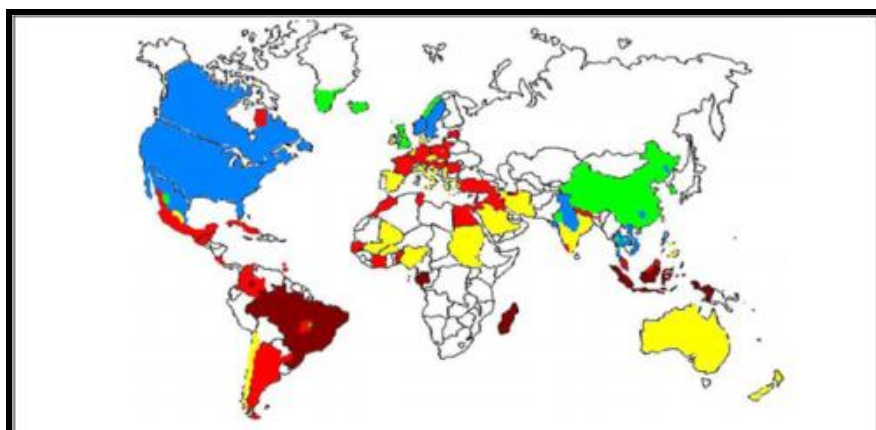


Figura 1.4: Distribuição global da toxoplasmose. A ilustração demonstra os registros de casos de toxoplasmose diagnosticados no mundo. As áreas em vermelho escuro representam uma prevalência maior que 60%, vermelho claro 40-60%, amarelo 20-40%, azul 10-20% e nas áreas em verde menor que 10%. Pappas e cols. (2009).

Fatores climáticos afetam a sobrevivência de oocistos no meio-ambiente e, por conseguinte, as taxas de infecção em animais produtores de carne. Prevalências mais elevadas são classicamente observadas em países tropicais com clima úmido e quente e, inversamente, as prevalências são menores em países áridos ou de clima mais frio (Tenter e cols., 2000; Dubey e cols., 2012). Muitas das variações de soroprevalência humana podem ser explicadas por hábitos alimentares (método de

cozinhar a carne, lavagem das mãos após manejo de carne e solo (jardinagem, por exemplo), os tipos de carne (maior prevalência de origem de suínos) ou a forma de se limpar vegetais), situação econômica, social, qualidade da água e do saneamento básico ou fatores culturais. A soroprevalência aumenta com a idade, mas a taxa de aquisição da infecção varia de acordo com o país, hábitos culturais e nível sócio-econômico (Tenter e cols., 2000; Dubey e cols., 2012; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

No Brasil, infecções por *T. gondii* são prevalentes tanto em humanos quanto em animais. A toxoplasmose clínica, especialmente em seres humanos, se mostra como um importante problema de saúde pública. Diante dessa alta prevalência e de alguns incentivos que o governo oferece, muitos grupos internacionais dispõem-se a estudar a epidemiologia e o controle da doença no país. Tais grupos, porém, enfrentam a realidade de muitos trabalhos iniciais sobre toxoplasmose no Brasil terem sido publicados em português, os quais, muitas vezes, não estão disponíveis para os pesquisadores em países de língua inglesa. Como antes dito, o Brasil tem uma taxa muito elevada de infecção por *T. gondii* em humanos, atingindo até 50% das crianças do ensino fundamental e uma grande faixa de 50-80% das mulheres em idade fértil apresentam anticorpos contra *T. gondii*. Além disso, o risco de contaminação durante a gravidez e transmissão fetal para mulheres não infectadas, altas é grande porque o ambiente está altamente contaminado com oocistos (revisto em Dubey e cols., 2012).

Por estes motivos, o ônus da toxoplasmose em crianças infectadas congenitamente também é muito alto. A partir de dados limitados da literatura sobre o rastreio de crianças IgM-positivas para *T. gondii* no momento do nascimento, sabemos que entre 5-23 crianças nascem infectadas, em um grupo de 10.000 nascidos vivos. Estes dados revelam, então, uma estimativa de 1 criança infectada em 1.000 nascimentos, totalizando 2.649 crianças sujeitas a nascerem com toxoplasmose congênita, anualmente, no Brasil. A maioria dessas crianças infectadas estão propensas a desenvolver sintomas ou sinais de toxoplasmose clínica. Entre estas, uma grande parte morre logo após o nascimento, 35% possui manifestação neurológica, incluindo hidrocefalia, microcefalia ou retardo mental. Outras 80% possuem lesões oculares e 40% apresenta perda de audição. Essa

severidade da toxoplasmose clínica em crianças brasileiras pode estar associada com características genéticas dos isolados de *T. gondii*, predominantes em animais e humanos no país (revisto em Dubey e cols., 2012).

1.2.2 Diagnóstico

Remington e colaboradores (1968) sugeriram pela primeira vez que a detecção de anticorpos IgM no sangue de cordão umbilical ou de soro infantil seria útil no diagnóstico da toxoplasmose congênita, uma vez que anticorpos IgM não atravessam a placenta, enquanto os IgG alcançam a placenta e, por conseguinte, o embrião/feto. No ano de 1980, o mesmo grupo adaptou o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA para detecção de anticorpos IgM no sangue de cordão umbilical. Pinon e colaboradores (2001) utilizaram uma modificação de ELISA-IgM, combinando-o com o ensaio de aglutinação (IgM-ISAGA) para eliminar a necessidade de um conjugado enzimático. Embora os testes de IgM não sejam perfeitos, provaram ser úteis para programas de triagem. Um simples teste de aglutinação direta utilizado por Montoya e cols. (2010), ao qual chamaram de teste de aglutinação modificada (MAT) tem sido utilizado extensivamente para o diagnóstico de toxoplasmose em animais. Burg e colaboradores (1989) foram primeiros em relatar a detecção de ADN de *T. gondii*, a partir de um único taquizoíto, por amplificação do gene B1, empregando a técnica de PCR. Vários testes subsequentes de PCR foram desenvolvidos utilizando genes-alvos diferentes. Em geral, esta técnica revelou-se muito útil para o diagnóstico clínico de toxoplasmose (revisto em Dubey e cols., 2009).

1.2.3 Tratamento

Os compostos atualmente utilizados na clínica para o tratamento da toxoplasmose são: pirimetamina e sulfadiazina, quase sempre em associação com ácido fólico, em gestantes. Em alguns casos específicos, a suplementação com ácido fólico em paralelo ao tratamento não atende à demanda de ácido fólico da gestação. Nestes casos, a clínica tem utilizado a atovaquona (Fig. 1.5), um composto análogo de ubiquinona (coenzima Q [CoQ]). A atovaquona se liga irreversivelmente ao complexo mitocondrial citocromo bc1; assim, os elétrons não

são capazes de passar das desidrogenases via CoQ para o citocromo c. O consumo de oxigênio em *Pneumocystis carinii* é inibida pelo fármaco sendo o transporte de elétrons também identificado como alvo da droga nesta espécie. Esta inibição pela atovaquona, apesar de não ser tão específica para o citocromo *bc1* do *T. gondii* (McFadden e cols., 2000; Doggett e cols., 2012), exerce algum efeito inibitório sobre a multiplicação dos parasitos, sem interferir no metabolismo do ácido fólico. Outras sulfas associadas ao trimetoprim, podem também ser usadas, sendo tão efetivas quanto a sulfadiazina, sulfapirazina, sulfametazona e sulfamerazina, na dose de 50 mg/kg, a cada 24 horas durante 2 semanas para humanos. Entretanto, em humanos a combinação de pirimetamina e sulfadiazina tem se mostrado eficaz contra taquizoítos, mas não contra bradizoítos. Já a clindamicina é mais ativa em cães e felinos, podendo ser administrada sem problemas via intramuscular. Porém, altas doses orais podem causar transtornos gastrintestinais (Oz e Tobin, 2012).

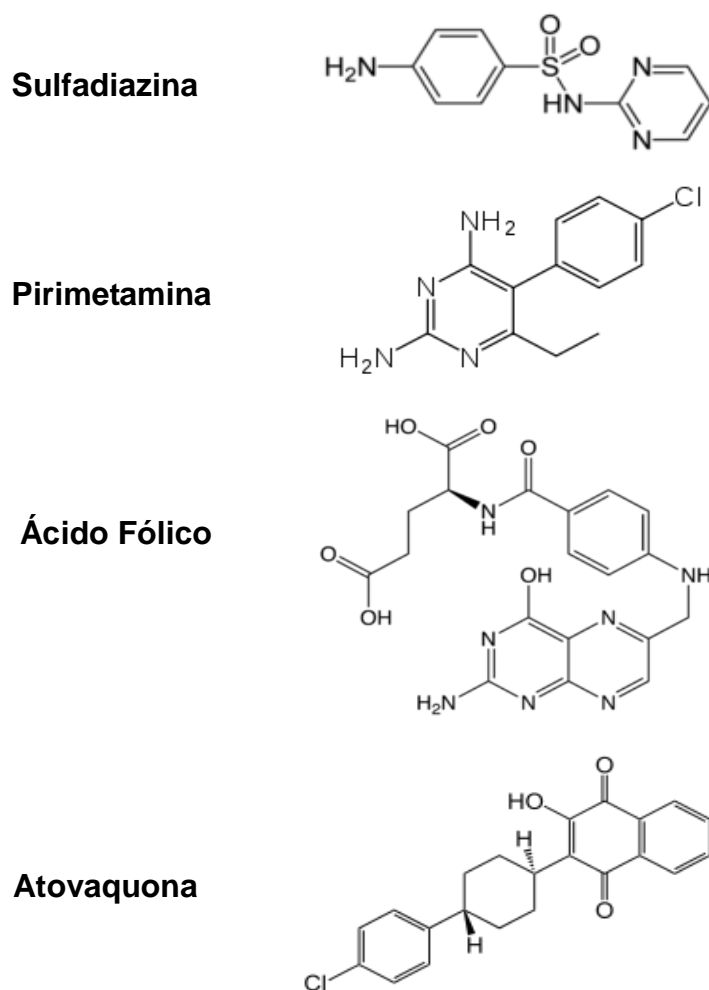


Figura 1.5: Compostos atualmente utilizados na clínica contra toxoplasmose. Estruturas moleculares dos compostos na terapia contra a toxoplasmose: Sulfadiazina, Pirimetamina, Ácido Fólico e Atovaquona. (Serranti e cols., 2011; Oz e Tobin, 2012).

Apesar de apresentar interessante efeito inibitório sobre a infecção por *T. gondii*, a inespecificidade do mecanismo de ação da Atovaquona tem gerado efeitos colaterais indesejados. Este fato tem impulsionado alguns grupos a sintetizarem moléculas análogas à Atovaquona com o objetivo de manter o efeito contra o avanço da infecção, porém, causando menores efeitos colaterais ao paciente (Hill e Dubey, 2002; Diniz e cols., 2003; Serranti e cols., 2011).

Selecionamos o composto ISA-34, sintetizado por Sharma e colaboradores em 2013, utilizando irradiação por micro-ondas, a qual tem produzido compostos com alto rendimento e em tempos mais curtos de reação (Fig. 1.6). A naftoquinona obtida por esta metodologia foi avaliada *in vitro* em sua atividade antimalárica, contra *Plasmodium falciparum*. Embora tenha demonstrado IC₅₀ de 3,1 µM, não demonstrou perfil melhor que os medicamentos de referência (Cloroquina IC₅₀ 100 nM) (Sharma e cols., 2013). Apesar disto, fica patente a possibilidade desta molécula apresentar atividade contra *T. gondii*, considerando a proximidade filogenética entre as espécies.

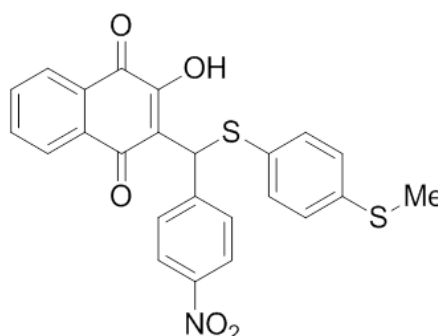


Figura 1.6: Composto derivado de atovaquona com alta afinidade pelo complexo mitocondrial citocromo *bc*1. Estrutura molecular do composto ISA-34 (Sharma e cols., 2013).

1.3. Célula muscular esquelética (CME) e linhagem C₂C₁₂

O cultivo primário de células musculares esqueléticas começou a ser desenvolvido por Konigsberg nos anos 1960-1963. Culturas primárias de tecidos embrionários foram obtidas a partir da dissociação mecânica, enzimática ou pela conjugação de ambas as técnicas (Konigsberg e cols., 1978) e cultivadas em meio suplementado com soro (soro de cavalo e fetal bovino) e extrato embrionário, o qual

é mitogênico. Além dessas propriedades, promove melhor adesão celular ao substrato e ainda, estimula a fusão de membranas. A adição de cálcio ao meio de cultura é fundamental para o início da fusão celular. Baixas concentrações de cálcio induzem a inibição da fusão celular e o incremento de mioblastos na cultura (Shainberg e cols., 1969). A partir da dissociação enzimática do tecido muscular, dois tipos celulares mononucleados podem ser obtidos: mioblastos e miofibroblastos. Por isso, é feito plaqueamento sequencial para separar os dois tipos celulares predominantes, devido às suas diferentes velocidades de adesão. Este método, inicialmente empregado no cultivo de células cardíacas foi estendido para outros tipos celulares (Inestrosa e cols., 1971).

Durante o processo de miogênese das células musculares esqueléticas, os mioblastos proliferam, se alinham durante a proliferação e, então, se fusionam formando miotubos que, por sua vez, continuam a se fusionar até a formação da miofibrila multinucleada (Fig. 1.8). A sequência das alterações morfofuncionais que as células sofrem ao longo da miogênese esquelética é: (1) mioblastos, (2) mioblastos competentes para fusão (miócitos), (3) miotubos jovens, (4) miotubos maduros e (5) miofibrila.

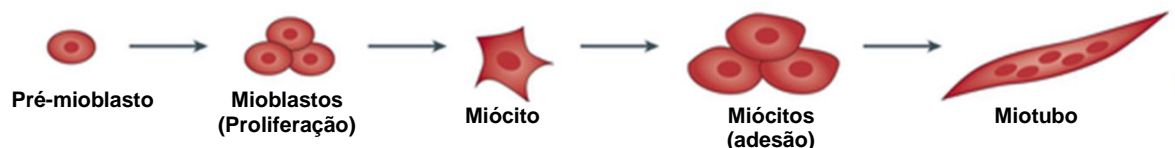


Figura 1.8: Processo de diferenciação da célula muscular esquelética. Esquema simplificado das alterações morfofuncionais durante a diferenciação celular a partir de células satélites progenitoras. Adaptado de Fatica e Bozzoni (2013).

A proliferação e a diferenciação são eventos independentes, pois o sinal que induz a proliferação geralmente inibe a diferenciação. A partir da fusão dos mioblastos, forma-se o músculo diferenciado, o qual é caracterizado pela presença de células multinucleadas sem limite de membranas (miotubos). Esta fusão dos mioblastos é dependente da constituição do meio e da densidade celular, tendo início num período de 5-6h após o plaqueamento e se dá, somente, entre os mioblastos que já tenham passado pelas mudanças específicas de diferenciação (Blondel e cols., 1970; Linkhart e cols., 1981; Inestrosa e cols., 1982; Guimarães e cols., 2008; Fatica e Bozzoni, 2013).

A obtenção e cultivo primário de CME são dependentes do fornecimento de animais de qualidade e aptos para o estabelecimento da cultura, como por exemplo, idade gestacional, adequada e cujo fornecimento nem sempre é garantido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório-Fiocruz. Portanto, para não interferir no fluxo da execução dos experimentos, foi adotada também como modelo de célula hospedeira para interação com *T. gondii* a linhagem celular de músculo esquelético C₂C₁₂, linhagem aderente morfológicamente como mioblastos e foi obtida a partir de explantes de músculo esquelético de camundongos (*Mus musculus*), da linhagem C3H, utilizada em estudos de distrofia muscular. Pode ser considerada permanente, em função de uma série de mutações dirigidas que a imortalizou, tornando-a competente para se manter viável por várias gerações (repiques), *in vitro*. Quando o meio de cultivo é restrito em mitógenos (restrição de soro fetal bovino) a linhagem diferencia-se rapidamente, formando miotubos contráteis e sintetizando proteínas musculares características (Yaffe e Saxel, 1977).

1.4. Interação parasito-célula hospedeira

Durante a infecção celular pelo *T. gondii*, primeiramente, ocorre o contato inicial entre a membrana plasmática do parasito e a membrana plasmática da célula hospedeira, que caracteriza a fase de reconhecimento celular. As moléculas de superfície, tais como, proteínas, carboidratos e lipídeos de membrana participam do processo de reconhecimento, adesão e invasão do parasito na célula (Jones e cols., 1972; Alexander e cols., 2005; revisto em Bradley e Sibley, 2007).

Organelas secretoras localizadas na região apical do parasito participam ativamente do processo de reconhecimento celular, da invasão e manutenção do parasito no interior da célula. Os micronemas estão envolvidos na adesão do patógeno à célula hospedeira e contém uma gama de proteínas como, AMA1, as MICs e a M2AP. Essas proteínas possuem domínios adesivos que interagem com alguns componentes de superfície da célula hospedeira. Algumas dessas proteínas possuem um domínio transmembrana e fazem parte do glideosoma (conjunto de proteínas inseridas na película com papel na movimentação do parasito), fazendo a conexão entre a célula hospedeira e a maquinaria interna do parasito (Soldati e cols., 2010).

A diversidade dos domínios adesivos, combinada com a capacidade das proteínas micronemais de formar complexos multiméricos, permite a otimização da interação do parasito com a superfície de vários tipos celulares (Brossier e cols., 2005a). A AMA1 (*apical membrane antigen*) é uma proteína micronemal que possui domínios adesivos e é secretada na superfície do parasito. É uma proteína transmembrana necessária à formação da junção móvel (uma estrutura transitória, formada durante a passagem do taquizoíta pela membrana da célula hospedeira), sua ausência também afeta a secreção das róprias e, como consequência, os parasitos perdem a capacidade de invadir (Alexander e cols., 2005; Boothroyd e Dubremetz, 2008). A TgMIC2 é essencial para a adesão à célula hospedeira, motilidade e invasão. Esta se liga a receptores na superfície da célula hospedeira e estabelece, simultaneamente, através do seu domínio citoplasmático C-terminal, ligação com o sistema actina-miosina do parasito, promovendo, em última análise, sua motilidade (Brossier e cols., 2005b).

Durante o processo de invasão, há a formação de uma constrição em torno do corpo do parasito, estabelecendo a junção móvel, que acompanha a penetração do parasito na célula hospedeira (Mordue e cols., 1999; Alexander e cols., 2005). Especula-se que esta região sirva como local de adesão das membranas do hospedeiro e do parasito e que funcionaria como uma “peneira”, selecionando os componentes da membrana do hospedeiro que irão para a membrana do vacúolo parasitóforo (Alexander e cols., 2005). Esta junção seria formada, principalmente, pelas proteínas TgAMA1, TgRON2, TgRON4 e TgRON5 e TgRON8 (Boothroyd e Dubremetz, 2008).

O processo de invasão propriamente dito envolve ainda, a membrana plasmática da célula hospedeira que então, se invagina concomitantemente com a formação do vacúolo parasitóforo, no qual o parasito ficará abrigado e em multiplicação intracelular (Shen e Sibley, 2012). No entanto, a entrada de taquizoítos e bradizoítos também pode ocorrer via participação ativa da célula hospedeira, como demonstrado na figura 1.7 (Jones e cols., 1972; Morisaki e cols., 1995; Guimarães e cols., 2008). Ensaios empregando dinasoro, um inibidor da via endocítica, confirmaram que a fagocitose é uma das vias de acesso do parasito à célula hospedeira (Kirchhausen e cols., 2008; Caldas e cols., 2009).

Os aspectos morfológicos que envolvem a invasão do parasito, em particular com formas bradizoítas, em CME, têm sido descritos por Guimarães e cols. (2008).

Uma estreita associação entre a membrana de bradizoítos e da célula hospedeira foi observada nos momentos iniciais da interação (Fig. 1.7), mostrando parasitos aderidos pela região apical, pela região posterior e também pela superfície filopodial de CME. Na fase de adesão, expansão da membrana plasmática da célula hospedeira envolvendo o parasito foi observada (Fig. 1.7).

As vias moleculares da interação do *T. gondii* com os diferentes tipos celulares presume-se ser multifatorial, considerando-se que o parasito infecta todas as células nucleadas, inclusive o núcleo ((Dubey, 2004, Barbosa e cols., 2005).

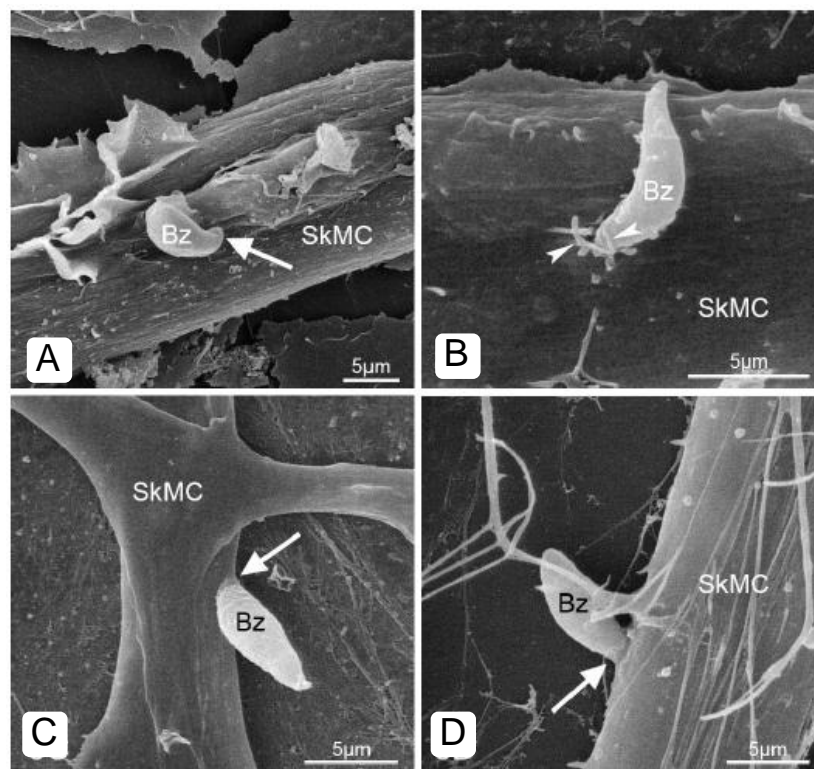


Figura 1.7 A-D: MEV de células musculares esqueléticas infectadas com bradizoítos (BZ) de *T. gondii*. Estreita associação entre a membrana da célula hospedeira e os parasitos, é observada após 15 min (A) e 2 h (B-D) de interação. Expansões da membrana plasmática de CME são observadas envolvendo os parasitos (B-D). Cabeças de seta indicam filopódios da CME. Guimarães e cols. (2008).

Durante e após a invasão, a membrana do vacúolo parasitóforo incorpora constituintes da célula hospedeira e do parasito, formando uma membrana de caráter híbrido, a qual protege o parasito contra mudanças de pH e radicais livres citosólicos. Muitos marcadores de superfície da célula hospedeira não se localizam na MVP no momento da entrada do parasito, o que contribui para que não haja a

fusão do vacúolo parasitóforo (VP) com organelas da via endocítica, tais como lisossomos (Jones e cols., 1972; Joiner e cols., 1990; Mordue e Sibley, 1997; Yamamoto e Takeda, 2012). A MVP viabiliza a manutenção e a replicação do parasito no interior do VP por permitir acesso aos intermediários de biossíntese do metabolismo da célula hospedeira. Para alterar a MVP, o parasito libera os conteúdos das róprias e dos grânulos densos (Carruthers, 2002).

As proteínas das róprias têm destinos diferentes, quando secretadas. As RONS formam um complexo com a AMA1, na região da junção móvel. 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 (Boothroyd e Dubremetz, 2008).

As proteínas dos grânulos densos são exocitadas durante e após a invasão do parasito, permanecendo solúveis no lúmen do VP ou tornam-se associadas à membrana do VP (MVP) ou à rede túbulovesicular (RTV), de estrutura membranosa, dentro do VP (Mercier e cols., 2002). Foram identificadas 12 proteínas GRA (GRA1-GRA14), sendo que GRA 11 e 13 são muito semelhantes, além de duas isoformas de nucleótido-trifosfato hidrolase (NTPase I e II) e dois inibidores da protease (TgPI 1 e 2) (revisto em Nam, 2009). A função dessas proteínas seria 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. Além disso, as ROPs participam mantendo uma íntima associação de mitocôndrias da célula hospedeira com o VP (Sinai e cols., 1997; Sinai e Joiner, 2001; Laliberté e Carruthers, 2008; revisto em Peng e cols., 2011).

O recrutamento de organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático da célula hospedeira para o VP é uma característica peculiar e marcante de taquizoítos de *T. gondii*, o qual é denominado pela literatura como associação organela-MVP (Sinai e Joiner 1997, 2001; Magno e cols., 2005; Laliberté e Carruthers, 2008; Gomes e cols., 2014). Pelo prisma funcional, a hipótese mais aceita, é que esta associação ocorreria para mediar a aquisição de lipídeos e outros intermediários para o parasito intracelular.

Gomes e cols. (2014) demonstraram que a infecção pelo *T. gondii* em células musculares provoca um efeito pronunciado sobre o metabolismo lipídico da célula

hospedeira através da regulação da biogênese de corpos lipídicos (CL) e recrutamento dessas organelas para o vacúolo parasitóforo. O aumento da formação de CL pode atuar como fonte de produção de prostaglandina, com implicações para a resposta imune do hospedeiro e pode representar uma fonte de lipídios e outros nutrientes para a sobrevivência do parasito. Assim, o aumento da CL, seguido do aumento da expressão de COX-2 e PGE 2 na CME, podem contribuir para o controle da síntese de IL-12 e IFN-g durante a infecção por *T. gondii* (Gomes e cols., 2014). O aumento dessas citocinas envolvidas na reparação e homeostase das células musculares após a lesão pode contribuir para o estabelecimento e a manutenção da fase crônica da infecção pelo *T. gondii*. Deste modo, fica estabelecida a necessidade de se investigar o envolvimento das mitocôndrias da célula hospedeira com o sucesso do parasitismo intracelular pelo *T. gondii*, inclusive com o processo da cistogênese (Sinai e Joiner, 1997; Laliberté e Carruthers, 2008; revisto em Peng e cols., 2011).

1.5. Mitocôndrias

Mitocôndrias são organelas exclusivas de eucariotos, possuem genoma próprio e são envoltas por duas membranas (interna e externa) (Lehninger e cols., 2008). Segundo a teoria endossimbiótica para a origem das mitocôndrias, estas derivam de arqueobactérias que invadiram células eucarióticas primitivas. A partir disto, se especializaram na produção de ATP, em detrimento de O₂ e substratos obtidos a partir da quebra de açúcares, aminoácidos e lipídios (revisto em Gray e cols., 1999). A membrana interna se estende com grande área de superfície por meio de invaginações em direção à matriz mitocondrial (Fig. 1.8).

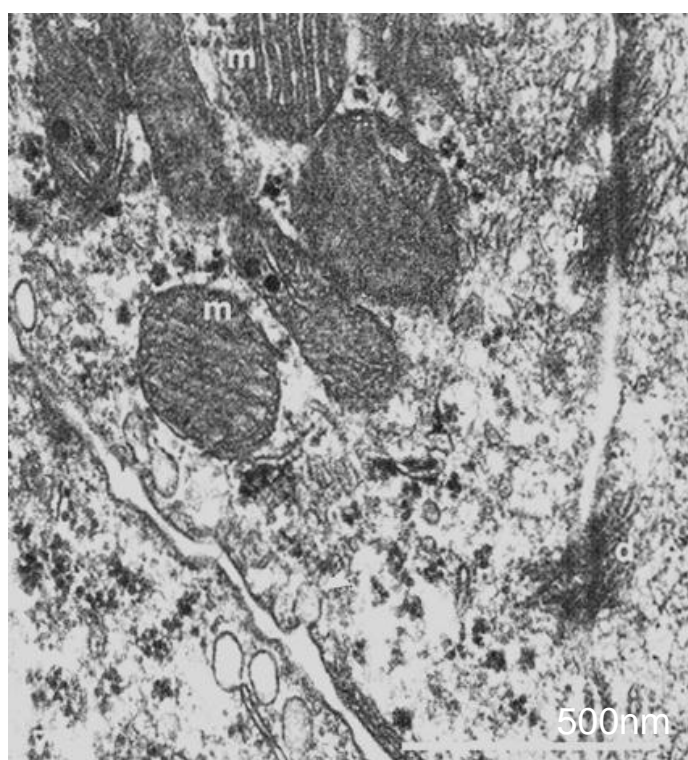


Figura 1.8: Mitocôndrias de músculo cardíaco. Imagem de MET de corte ultrafino de músculo cardíaco, que favorece a visualização de mitocôndrias (m) e sua estrutura interna, constituída por cristas. d, desmossomos. (Meirelles e cols., 1986).

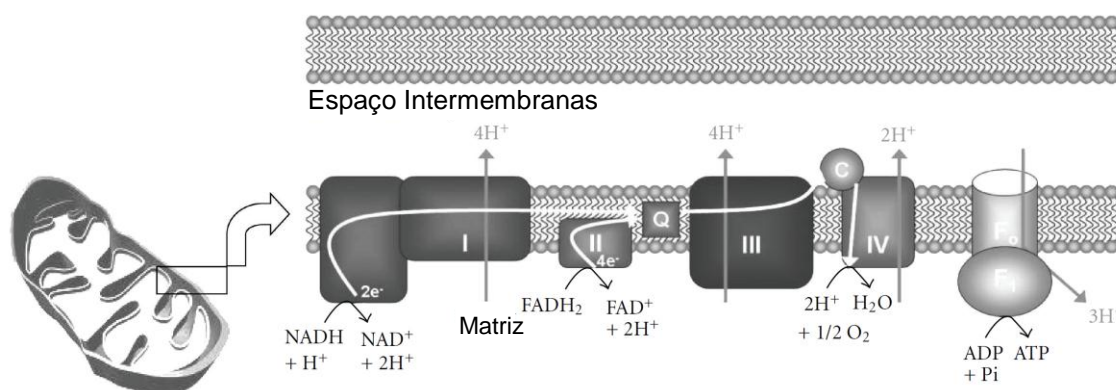


Figura 1.9: Esquema do Sistema de Transporte de Elétrons (STE) que ocorre na mitocôndria. A figura representa o STE com os seus complexos proteicos (I – V) inseridos na membrana mitocondrial interna, que passam por reações de oxirredução e fazem o bombeamento de prótons, da matriz para o espaço intermembranar, culminando com a produção de ATP (fosforilação oxidativa) pelo complexo V (F₁F₀-ATPase). (Peterson e cols., 2012).

A produção em massa de energia útil (ATP) se dá à custa de uma alta produção colateral de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar sérios danos às suas membranas ao ponto de rompê-las em condições extremas e/ou patológicas. Como prevenção desse auto envenenamento, as mitocôndrias possuem mecanismos que vão de enzimas detoxificadoras, tais como peroxidases, e superóxido dismutase, que reduzem estas EROs a moléculas menos tóxicas, até proteínas desacopladoras (UCPs) do sistema de transporte de elétrons (STE), que promovem o refluxo de prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, neutralizando as EROs (Gutteridge e cols., 1993; Indo e cols, 2007; Fu e cols., 2014).

O Sistema de Transporte de Elétrons (STE), também conhecido como Cadeia Respiratória, é composto por complexos proteicos (numerados de I – V), inseridos na membrana interna da mitocôndria. Estes complexos promovem um fluxo de elétrons oriundos de cofatores (NADH e FADH_2) que são gerados no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (CAT) que ocorre na matriz mitocondrial. A nomenclatura destes complexos se dá em função dos substratos e dos produtos envolvidos em cada etapa específica do fluxo eletrônico, onde o complexo promove uma reação de oxirredução com conseqüente translocação de prótons da matriz para o espaço intermembranar, culminando com a produção de ATP (fosforilação oxidativa) pelo complexo V (F_1F_0 -ATPase) (Chance e Williams, 1956; Mitchell, 1966) (Fig. 1.9). O complexo I é denominado NADH-Coenzima Q (Ubiquinona) oxidorredutase, o II de Succinato-Coenzima Q oxidorredutase, o III de Coenzima Q-Citocromo c oxidorredutase (Citocromo *bc1*) (Fig. 1.10), o IV de Citocromo c oxidase e o V de F_1F_0 -ATPase (Lehninger e cols., 2008) (Fig. 1.9).

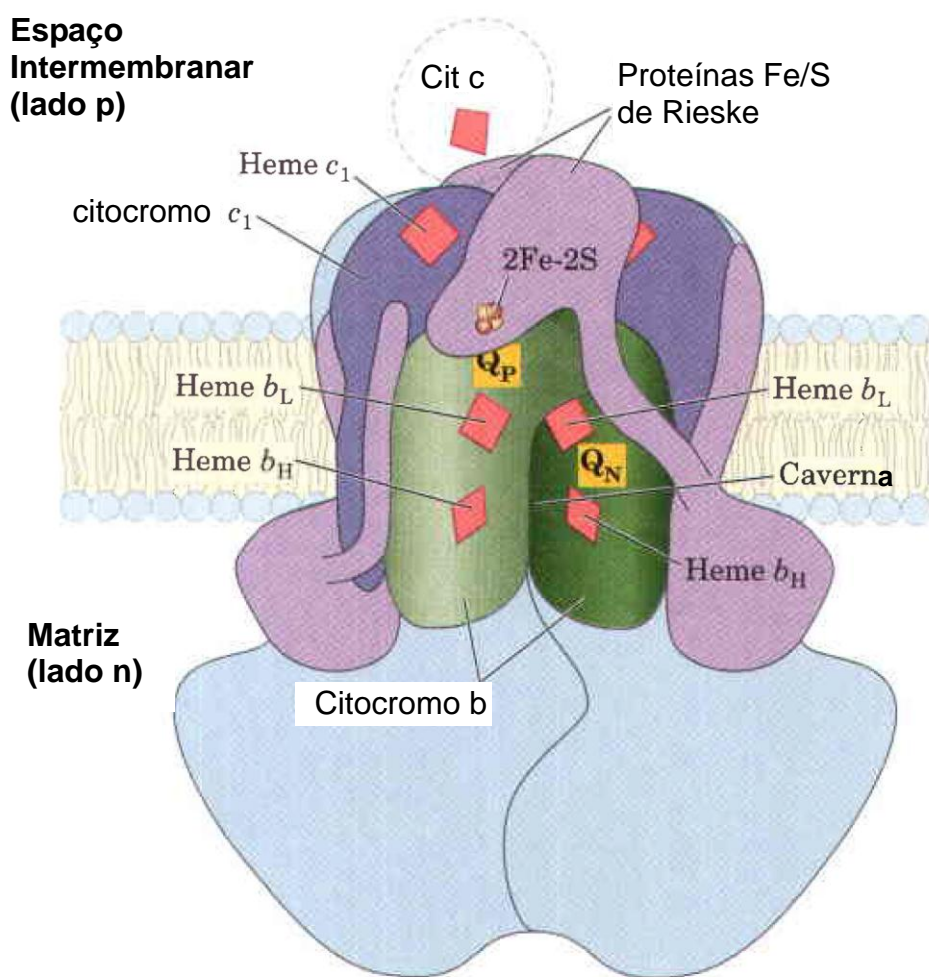


Figura 1.10: Citocromo *bc*1 (Complexo III) presente na membrana mitocondrial interna. A estrutura dimérica é fundamental para a função do complexo III. A figura mostra como o citocromo *c*₁ e a proteína Fe/S de Rieske se projetam a partir da superfície p e interagem com o citocromo *c*. A interface entre os monômeros forma a caverna, que abriga as ubiquinonas Q_P e Q_N. O citocromo *b* é o cerne funcional do complexo. Este possui dois locais distintos para ligação das ubiquinonas. Lehninger e cols., (2008)

Devido ao fato do composto ISA-34 ser um derivado da Atovaquona, que por sua vez é um análogo da ubiquinona, os sítios de ligação para as ubiquinonas Q_P e Q_N no citocromo *b* (Fig. 1.10), provavelmente, correspondem aos sítios de ligação do composto ISA-34, que bloqueia a fosforilação oxidativa, por interromper o fluxo eletrônico no STE (Sharma e cols., 2013).

1.6. Associação de organelas da célula hospedeira com a membrana do vacúolo parasitóforo de *T. gondii*

Durante a invasão de células eucarióticas, tanto por endocitose quanto por penetração ativa, ocorrem sinalizações que disparam o processo de fusão fagolisossomal, o qual constitui umas das principais linhas de defesa intracelular. Neste caso, a vesícula fagocítica é fusionada aos lisossomos no interior da célula e seu conteúdo é, na maioria dos casos, digerido pela ação de enzimas proteolíticas.

Por outro lado, em uma infecção por *T. gondii*, o parasito, através de mecanismos ainda não bem esclarecidos, evita a fusão fagolisossomal (Jones e cols., 1972; Mordue e Sibley, 1997; De Souza, 2005; Yamamoto e Takeda, 2012). Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando que, além de evitar a fusão com lisossomos, o *T. gondii* desde os primeiros momentos de sua entrada através da secreção do conteúdo das róptrias (Sinai e cols., 1997, 2001), promove o recrutamento de outras estruturas da célula, tais como, mitocôndrias, retículo endoplasmático e corpos lipídicos (Fig. 1.11). Devido ao seu marcante papel na geração de energia para as células eucarióticas, a hipótese atualmente mais aceita para justificar este recrutamento feito pelo parasito, é a de que o mesmo promova a associação da membrana do vacúolo parasitóforo com mitocôndrias, com o retículo endoplasmático e com corpos lipídicos para se valer da energética da célula hospedeira, favorecendo a garantia do seu desenvolvimento intracelular e sua manutenção durante a fase crônica da infecção (Sinai e Joiner 1997; Laliberté e Carruthers, 2008; revisto em Peng e cols., 2011; Gomes e cols., 2014).

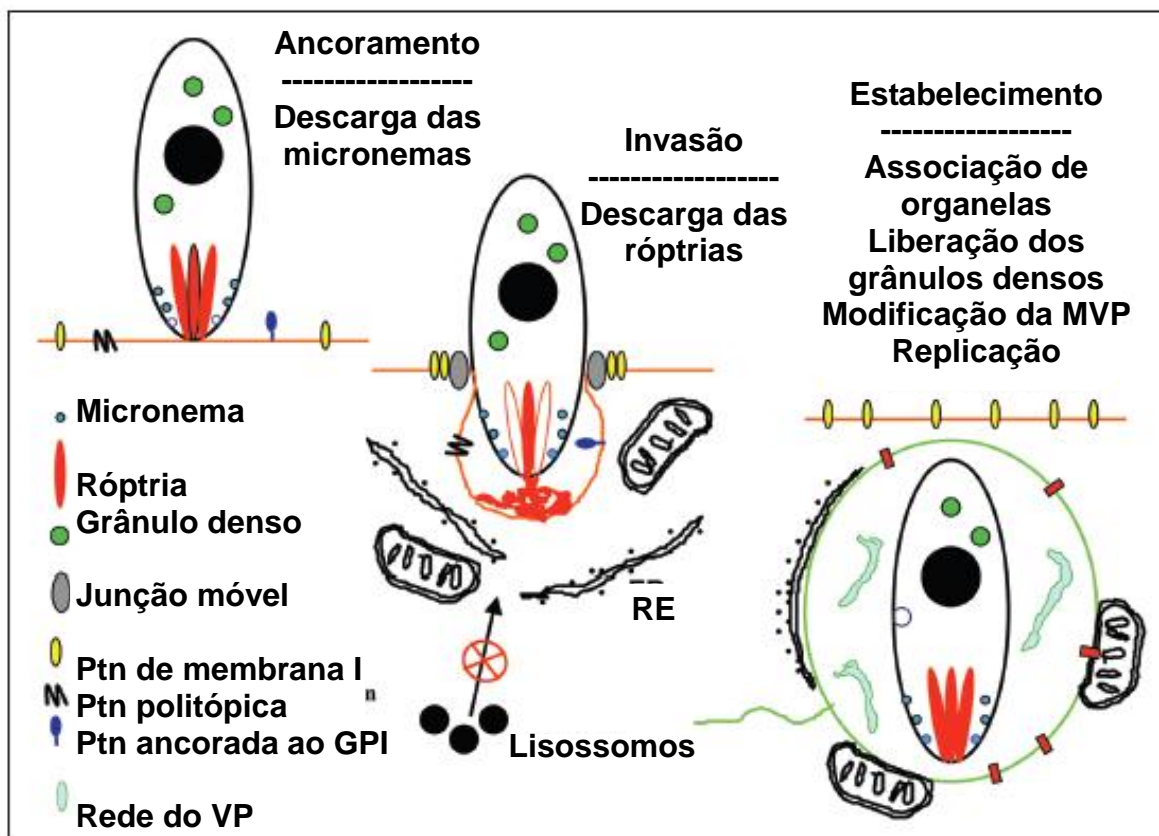


Figura 1.11: Esquema da interação *T. gondii*-célula hospedeira. etapas decorrentes na interação do parasito com célula hospedeira onde ocorre associação direta de mitocôndrias da célula hospedeira com a MVP. Secreção de proteínas de micronemas e róptrias interagem com a membrana do vacúolo parasitóforo formando uma membrana híbrida que se associa com organelas da célula hospedeira (modificado de Sinai, 2008).

A despeito deste conhecimento, recentemente um trabalho relatou a multiplicação de taquizoítos no interior de células cujo metabolismo mitocondrial fora interrompido. Estes dados remetem à ideia de que taquizoítos podem se multiplicar rapidamente com certa independência da energética da célula hospedeira, durante a fase aguda da infecção (Magno e cols., 2005). Contudo, a fonte de energia para a manutenção de estruturas complexas e perenes como cistos teciduais, presentes na fase crônica da infecção, ainda não é bem compreendida (Sinai e Joiner, 1997, 2001; Sinai, 2008; Cuomo e cols., 2013).

Até 2001, a célula muscular esquelética não tinha sido objeto de investigação nos estudos da interação *T. gondii*-célula hospedeira, apesar da sua importância na disseminação, transmissão e persistência da infecção. Dentre os cerca 2,5% de

trabalhos que abordam a cistogênese *in vitro* e *in vivo* (fonte: Pubmed abril 2014) e analisam os bradizoítos e seus cistos teciduais, a sua grande maioria utiliza linhagens celulares não relacionadas ao desenvolvimento da fase crônica da doença. Nos últimos anos, nosso grupo tem trabalhado com culturas primárias de células musculares esqueléticas como modelo experimental para o estudo da dos aspectos celulares da interação *T. gondii*-célula hospedeira o que abre novas perspectivas de investigação neste campo (Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008, 2009; revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; 2009a, b; Gomes e cols., 2011; 2014).

Neste projeto, avaliamos a participação de organelas da célula muscular esquelética no desenvolvimento da cistogênese, a fim de agregar novos dados ao conhecimento da resposta celular frente à infecção pelo *T. gondii*.

JUSTIFICATIVA

O caráter inovador se caracteriza pelo emprego de CME como modelo de célula hospedeira, pois é nicho natural para o parasitismo crônico do *T. gondii* e um dos tecidos de eleição onde se estabelece a cistogênese. Este modelo vem sendo explorado pelo nosso grupo desde 2001, permitindo a geração de novos conhecimentos relacionados a essa importante via de sustentabilidade evolutiva do parasito (Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008, 2009; revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; 2009a, b; Gomes e cols., 2011, 2014). Outro aspecto a considerar é o emprego de bradizoítos como inóculo primário em cultura de CME, estratégia utilizada por poucos grupos de pesquisa (Guimarães e cols., 2008; 2009). A maioria utiliza tipos celulares distintos como modelo de estudo, mas que não estão envolvidos com a fase crônica da infecção *in vivo* e taquizoítos como fonte de infecção (Bohne e cols., 1993a, b; Weiss e cols., 1995; Halonen e cols., 1996; Sasono e Smith, 1998; Caldas e cols., 2009).

Desta forma, o emprego de bradizoítos para infecção de CME tem relevância pelo escasso conhecimento dos eventos moleculares e celulares decorrentes dessa interação e a resposta do parasito a esse microambiente celular altamente cistogênico (Ferreira-da-Silva e cols., 2008, 2009). Como destaque, a investigação da biologia de bradizoítos no interior da célula, onde se mantém e transmite a infecção, pela ingestão de carne crua ou mal passada, é um capítulo na biologia do *T. gondii* que ainda merece uma atenção especial. Nossa proposta de desvendar a relação deste estágio infectivo, correlacionando aspectos morfológicos com funcionais e metabólicos de CME, é pioneira e deverá contribuir para abertura de novas linhas de pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o envolvimento das mitocôndrias e do retículo endoplasmático de CME com o desenvolvimento da cistogênese do *Toxoplasma gondii*.

2.2 Objetivos Específicos/Metas

2.2.1 Monitorar a distribuição e a funcionalidade de mitocôndrias da CME infectada com bradizoítos de *T. gondii*, visando verificar a associação da organela com cistos teciduais durante a cistogênese, *in vitro*;

2.2.2 Estudar os aspectos ultraestruturais da interação de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da CME com a membrana do vacúolo parasitóforo e com a parede cística de *T. gondii*;

2.2.3 Avaliar a fisiologia mitocondrial do sistema em interação CME-*T. gondii* por respirometria de alta resolução para investigar uma possível regulação do metabolismo mitocondrial da célula hospedeira pelo parasito durante a cistogênese;

2.2.4 Investigar o efeito do composto ISA-34 sobre a cistogênese do *T. gondii*.

3. MATERIAIS 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. Cultura primária de CME

Considerando-se a predileção do *T. gondii* em encistar, dentre outros tecidos, nos tecidos musculares esqueléticos e tecido nervoso (Guimarães e cols., 2008) foram utilizadas como modelo celular para este estudo, CME. Essas células foram obtidas a partir do músculo da coxa de fetos de camundongos com 18-20 dias de gestação. As fêmeas foram sacrificadas em câmara mortuária contendo dióxido de carbono (CO₂), seguido do deslocamento cervical. O tecido muscular foi dissecado, com a retirada da pele e dos tecidos ósseo e cartilaginoso e, em seguida, fragmentado com auxílio de bisturi. Os fragmentos foram lavados por 5 min, para a remoção de hemácias, em solução de Ringer pH 7.2 em placa agitadora aquecida a 37°C, seguida de lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7.2. O tecido muscular foi dissociado em solução enzimática contendo 0,05% de tripsina e 0,01% de verseno diluída em PBS, pH 7.2, mantido sob agitação a 37°C por 10 min. Este procedimento foi repetido até a dissociação total do tecido. A suspensão celular foi centrifugada e ressuspensa em meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco DMEM-F12 suplementado com 10% de soro de cavalo, 5% de soro fetal bovino, 1% de extrato embrionário de pinto, 1% de solução de antibióticos Sigma-Aldrich e 7 mM de CaCl₂ diluído em PBS. O método de plaqueamento sequencial foi utilizado para enriquecimento da cultura com mioblastos. Para as análises ultraestruturais, as culturas foram semeadas em placas de 60 mm² com cerca de 1,0 x 10⁶ de células/placa e para os ensaios de fluorescência, em placas de 24 poços com cerca de 5,0 x 10⁴ células por poço. As células foram incubadas em estufa úmida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em média por cinco dias, para ensaios experimentais.

3.2. Manutenção da linhagem de células musculares esqueléticas C₂C₁₂

A linhagem C₂C₁₂ é aderente e se apresenta, morfologicamente, como mioblastos e foi obtida a partir de explantes de músculo esquelético de camundongos (*Mus musculus*), da cepa C3H, utilizada em estudos de distrofia muscular (ATCC CRL1772; Yaffe e Saxel, 1977). As células foram semeadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ /ml em garrafas de cultura celular de 25 cm² (Corning), em meio DMEM/Hams F12 - Sigma-Aldrich, suplementado com 1% de solução de antibióticos Sigma-Aldrich, 10% de soro fetal bovino (SFB – CultLab) e 7 mM de CaCl₂ e mantidas em estufa úmida em atmosfera de 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. A cada três dias, o meio era descartado e o mesmo volume de meio fresco adicionado às garrafas de cultura. As células foram cultivadas até atingirem, aproximadamente, 90% de confluência. Neste ponto, as células foram tratadas com solução de dissociação (salina tamponada com fosfato - PBS, contendo 0.025% de ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA, e 0,01% de tripsina) durante 1-2 min a 37°C. Após dissociação, a suspensão celular foi colocada em DMEM com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina, centrifugada durante 7 min a 650g à temperatura de 4°C. As células foram quantificadas com o auxílio de câmara de Neubauer e replaqueadas em placas de 60 mm² com cerca de $1,0 \times 10^6$ de células/placa, para as análises ultraestruturais, e em placas de 24 poços com cerca de $5,0 \times 10^4$ células por poço, para os ensaios de fluorescência. Antes da interação, as células foram mantidas em meio de cultura contendo 1% de SFB, em média por 120 h, para induzir a miogênese (formação de miotubos, a partir da diferenciação de mioblastos) e, em seguida, infectadas com *T. gondii*.

3.3. Obtenção dos parasitos

3.3.1. Bradizoítos

Fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 fornecidas pelo CECAL, pesando 15-18g, foram inoculadas via intraperitoneal com cerca de 50 cistos teciduais ME49 (Cedida pelo Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil). E após 4-8

semanas pós-infecção, os cistos teciduais foram isolados e purificados a partir do cérebro dos camundongos para posterior utilização nos ensaios experimentais e para manutenção da cepa em passagens *in vivo*.

O procedimento para obtenção de cistos consistiu em retirar os cérebros dos camundongos infectados, lavagem com solução de Ringer, seguida da trituração e homogeneização em PBS. Objetivando separar os cistos dos debris celulares e obter uma solução mais purificada, o macerado foi colocado em gradiente de 25% de Dextran (Sigma-Aldrich). Para obtenção de formas bradizoítas, os cistos foram incubados, sob agitação, por 1-5 min a 37°C, numa solução aquosa de pepsina, em pH ácido, diluída na proporção de 1:5 (pepsina ácida: cistos), visando a dissolução da parede cística. Para neutralização da atividade enzimática foi utilizada a solução de carbonato de sódio a 1% e a solução contendo os parasitos foi lavada três vezes, em meio DMEM-F12. O número de parasitos isolados foi estimado em câmara de Neubauer e os parasitos foram imediatamente utilizados nos experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira. (Guimarães e cols., 2008).

3.3.2. Taquizoítos

Os bradizoítos, obtidos a partir do isolamento descrito acima, foram também utilizados para infectar, na proporção de 10:1 (parasito-célula hospedeira), culturas de células musculares esqueléticas da linhagem C₂C₁₂ em garrafas de 25 cm², mantidas em estufa úmida a 37°C, contendo 5% de CO₂ atmosférico. Após períodos entre 48-72 h pós-infecção, o meio de cultura enriquecido com taquizoítos foi recolhido destas garrafas, centrifugado durante 7 min a 650g e taquizoítos foram imediatamente utilizados nos experimentos com CME e C₂C₁₂.

3.4. Interação parasito-célula hospedeira

As culturas primárias e de linhagem de músculo esquelético foram infectadas com bradizoítos ou taquizoítos da cepa do tipo II ME49 de *T. gondii*.

Os ensaios de interação foram realizados na proporção de 1:1 (parasito-célula hospedeira), com pH 8.2, durante períodos que variaram de 1 a 14 dias pós-

infecção. Após lavagem em PBS, as culturas foram fixadas e processadas de acordo com os experimentos previstos na dissertação.

3.5. Análise ultraestrutural por MET

O processamento do material para análise ultraestrutural consistiu na fixação das amostras em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0.1M contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl₂, pH 7.4 por 30 min a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M com 3,5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl₂, pH 7.4 contendo 0,8% de ferricianeto de potássio por 1 h a 4°C. Em seguida, as culturas foram lavadas três vezes no mesmo tampão por 10 min cada banho, desidratadas em série crescente de acetona e embebidas em resina Polibed. Cortes ultrafinos de 60-80 nm foram obtidos e recolhidos em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para serem observados ao MET FEI SPIRIT 120 kV da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) e no MET Jeol JEM-1011 80 kV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz.

3.6. Técnicas para visualização de mitocôndrias e cistos por microscopia de fluorescência

As células, após diferentes períodos de interação com o *T. gondii*, foram incubadas em meio simples contendo Mitotracker RedCMXRos (Molecular Probes), um indicador confiável da viabilidade mitocondrial por emitir fluorescência quando reduzido no espaço intermembranar. O marcador foi usado na concentração de 150 nM por 30 min, em estufa úmida, a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂. Logo em seguida, foram fixadas em solução de formaldeído 4% e lavadas em PBS. Para a permeabilização das membranas celulares foi utilizado o detergente Triton X-100 a 0,5% por 10 min. As células foram lavadas 3x por 10 min com PBS e, a seguir, incubadas com a lectina de *Dolichos biflorus* conjugada a fluoresceína (DBA-FITC) (10 µg/ml), para que os resíduos de N-acetil-galactosamina da parede cística fossem reveladas. Após esta incubação as células foram lavadas e montadas em lâminas

com o reagente “ProLong® Gold antifade + DAPI” (Invitrogen) e observadas ao microscópio confocal de varredura a laser (LSM-710, Zeiss, Alemanha) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO).

3.7. Respirometria de alta resolução das culturas infectadas

Culturas de células C2C12 infectadas e não infectadas por taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* foram tripsinizadas em solução de dissociação em salina tamponada com fosfato - PBS, durante 1-2 min a 37°C. Após dissociação, a suspensão celular foi colocada em DMEM com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina, centrifugada durante 7 min a 650g a 4°C. As células foram quantificadas com o auxílio de câmara de Neubauer. O consumo de oxigênio foi monitorado através de oxigrafia de alta resolução (OROBOROS® Oxygraph-2K Instruments, Innsbruck, Áustria) do Centro Biomédico, Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ. Os ensaios foram feitos em câmara contendo 2 ml de meio DMEM completo, pH 7,2 a 37°C. A razão do coeficiente respiratório (RCR), razão entre o consumo no estado 3 e no estado 4, foi obtida a partir da adição de oligomicina, durante as medições do consumo de oxigênio.

3.8. Ensaio do efeito de composto ISA-34 sobre a interação *T. gondii*-C2C12

As culturas infectadas por 48 h e 96 h com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii*, foram lavadas e tratadas com o composto ISA-34 por 48 h (Sharma *et al.*, 2013) em três diferentes concentrações (1,55 µM, 3,1 µM e 6,2 µM) em estufa úmida a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. A seguir, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de formaldeído a 4% em tampão PBS por 5 min à temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas em PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 30 min e novamente lavadas com tampão PBS. A seguir, as células foram incubadas por 60 min com DBA-FITIC) (10 µg/ml) (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Após a incubação, as células foram lavadas e montadas em lâminas com o reagente “ProLong® Gold antifade + DAPI” (Invitrogen) e observadas ao microscópio confocal a laser (LSM-710, Zeiss, Alemanha) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO). O número de cistos foi

determinado por contagem fotográfica no microscópio de fluorescência que considerou a quantidade dessas estruturas em grupos de quatrocentas células musculares (contadas por meio do marcador DAPI).

4. RESULTADOS

4.1. Funcionalidade mitocondrial da célula muscular esquelética infectada com bradizoítos da cepa ME49 em diferentes períodos de interação

A citoquímica para revelação de mitocôndrias com Mitotracker Red em CME não infectadas mostrou grande quantidade de mitocôndrias ativas com distribuição paralela ao eixo longitudinal celular (Fig. 4.1.1).

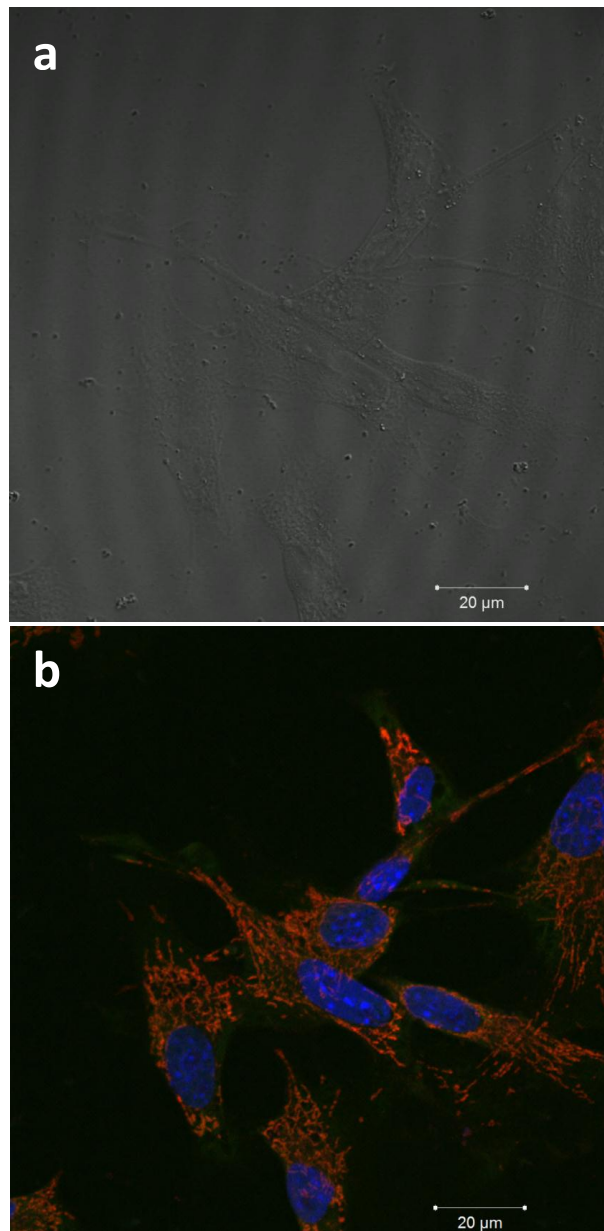


Figura 4.1.1: Morfologia de CME e organização mitocondrial. Imagem de microscopia de contraste diferencial interferencial (DIC) (a) e imagem de fluorescência após marcação com Mitotracker Red (revelação de mitocôndrias) e DAPI (em azul, marcação de núcleos) mostrando a distribuição longitudinal das mitocôndrias ao eixo longitudinal das células (b).

A infecção com bradizoítos da cepa ME49 de *T. gondii*, avaliada após 72 h de interação, alterou o perfil da distribuição das mitocôndrias, visualizada pelo Mitotracker, que se reorganizam em torno do cisto, que foi revelado pela marcação com a lectina *Dolichos biflorus* conjugada à fluoresceína (DBA-FITC) (Fig. 4.1.2).

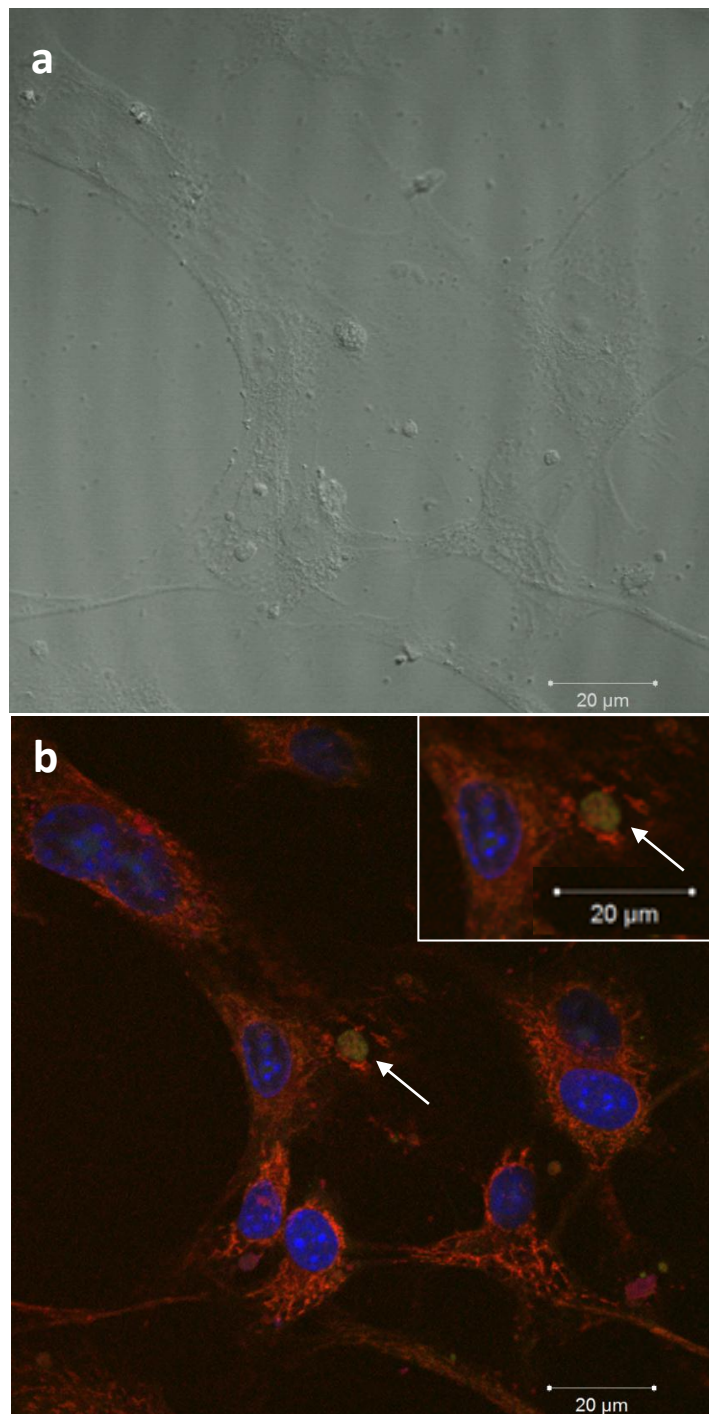


Figura 4.1.2: Morfologia de CME e organização mitocondrial durante encistamento por bradizoítos da cepa ME49 de *T. gondii*, após 72 h de interação. Imagem por DIC (a) e imagem de fluorescência (b) da cultura de CME infectada. Nota-se o cisto revelado pela marcação em verde (lectina DBA-FITC) da parede cística as mitocôndrias em vermelho (Mitotracker) e os núcleos em azul (DAPI). É nítida a presença das mitocôndrias circundando o cisto (seta).

A análise de tempos mais longos da interação bradizoítos-célula muscular aponta claramente um aumento no tamanho dos cistos teciduais (dados não mostrados) e a persistência das mitocôndrias circundando os cistos (Fig. 4.1.3).

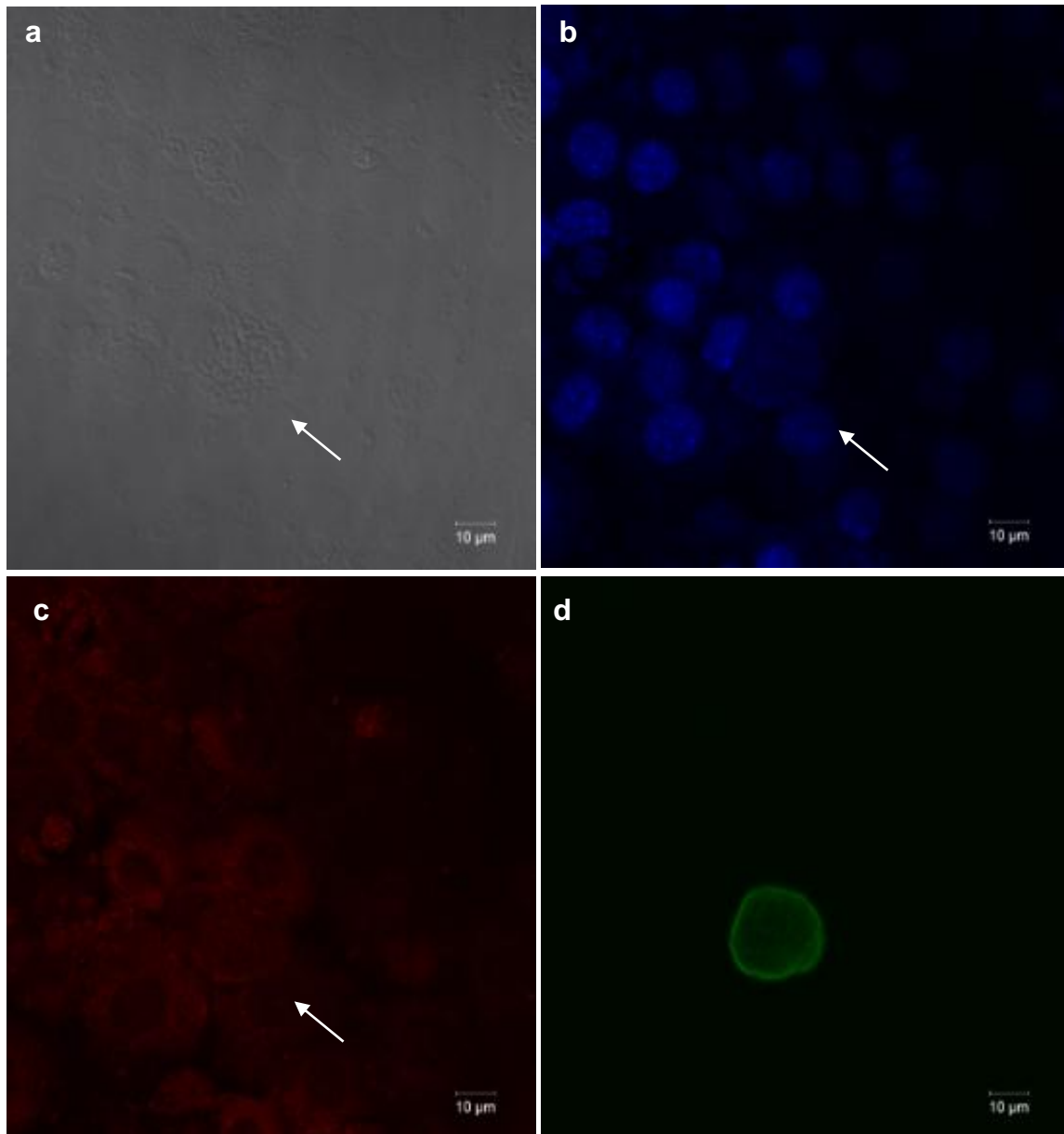


Figura 4.1.3: Monitoramento da associação de mitocôndrias ativas com cistos teciduais de *T. gondii* durante a cistogênese. Célula muscular esquelética (C₂C₁₂) em interação com bradizoítos da cepa ME49 de *T. gondii*, por 144 h, em meio alcalino (pH 8.2). Imagens da cultura por DIC (a), dos núcleos em azul marcados com DAPI (b), das mitocôndrias em vermelho marcadas com Mitotracker Red CMXRos (c), do cisto tecidual, em verde, marcado com DBA-FITC (d).

4.2. Análise ultraestrutural da associação de organelas da célula muscular esquelética com a membrana do vacúolo parasitóforo de bradizoítos da cepa ME49 de *T. gondii*

Dada a particularidade da CME em apresentar grande quantidade de mitocôndria, em função da sua inerente fisiologia, esta se constitui como um modelo ideal para avaliação do comportamento desta organela, durante processos de interação celular, como por exemplo, durante a infecção do parasito intracelular obrigatório, *T. gondii*. A análise ultraestrutural de células em que a miogênese foi estabelecida *in vitro*, mostrou características da organização paralela longitudinal das mitocôndrias com relação ao eixo principal das células em consonância com a estrutura do tecido muscular *in vivo* (Fig. 4.2.1 a-d).

Culturas primárias de CME infectadas com bradizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* na proporção 1:1 (parasito-célula) foram avaliadas, após períodos que variaram de 72 h até 10 dias de interação. Os processos de adesão e invasão do *T. gondii* em células hospedeiras são eventos, que podem durar menos de 30 segundos, para que o parasito seja encontrado num compartimento envolto por membrana no citoplasma da célula hospedeira, o vacúolo parasitóforo (VP). Determinar o quão recente foi essa invasão é tarefa impossível de se avaliar e pode incorrer em erros. Frente a essa realidade, optamos por analisar o fenômeno da invasão do parasito e a interação do VP com organelas da célula hospedeira, traçando alguns parâmetros que possam nos auxiliar a entender, não temporalmente, mas sim a dinâmica desse evento com base na identificação dos estágios infectivos, nas diferentes etapas do ciclo celular e as alterações morfológicas do VP decorrentes do processo de encistamento. Algumas das análises que serão descritas deverão estar relacionadas com a influência da infecção primária com bradizoítos e sua diferenciação intravacuolar em taquizoítos.

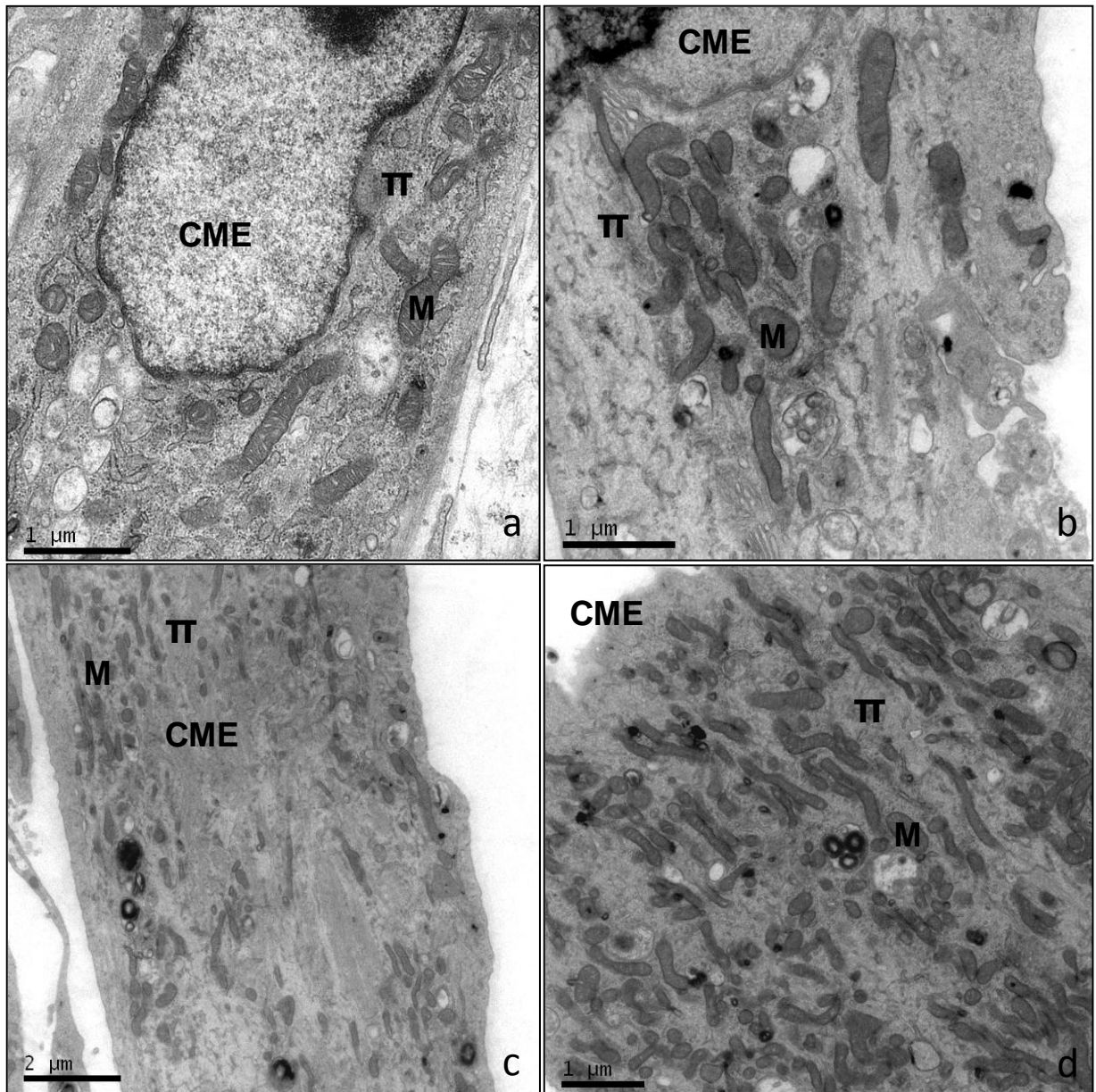


Figura 4.2.1a-d: Organização e distribuição das mitocôndrias nas células não infectadas observadas por MET. CME, já diferenciadas em miotubos, normalmente, apresentam as mitocôndrias em um padrão de distribuição e uma organização do tipo paralela ao eixo longitudinal celular (π) (a-d).

A análise de mais de duas centenas de imagens de cortes ultrafinos de culturas infectadas, após 3-10 dias de interação, mostrou diferentes aspectos da resposta celular à presença do VP contendo bradizoítos de *T. gondii* (Fig. 4.2.2a-a´). Dentre as diferentes respostas da célula hospedeira, nosso foco foi concentrado na ocorrência de interações entre mitocôndrias, RE e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (Fig. 4.2.2a´-a´´). Assim, estabelecemos alguns critérios que foram: a presença de VPs contendo um único bradizoíto, proveniente de uma infecção recente (reinfectação) ou de uma célula com uma infecção primária com bradizoíto, sem ter ocorrido a conversão para taquizoíto; outro parâmetro foi avaliar as formas em transição (que se caracterizam pela baixa quantidade de grânulos de amilopectina, por exemplo); vacúolos contendo dois ou mais parasitos (produto da divisão celular); vacúolos mistos contendo ambos os estágios infectivos/evolutivos e, ainda, células com vacúolos múltiplos contendo número variável de parasitos no seu interior, após 72 h de infecção (Fig. 4.2.2a-a´).

A análise de CME infectadas com um único parasito, com características de bradizoíto (grânulos de amilopectina presentes), indicativo de entrada recente, mostrou a distribuição das mitocôndrias ainda longitudinal ao VP (Fig. 4.2.3 a). Uma vista panorâmica dessas células denota que ocorreu a distribuição de mitocôndrias para o entorno desses vacúolos com uma tendência de distribuição radial (Fig. 4.2.3 b). Outros exemplos desta distribuição radial foram observados nas figuras 4.2.4 a, b, b'. Culturas de CME contendo um único bradizoíto apresentaram uma rede túbulo vesicular (RTV) bem desenvolvida, preenchendo praticamente toda a matriz vacuolar, com associação de RE à MVP (Fig. 4.2.5a). Outro aspecto dessa interação foi a presença de formas em transição produzindo a RTV, a qual é classicamente secretada pelo poro posterior, como bem demonstrada na figura 4.2.5b. Além disso, mitocôndrias foram vistas nas proximidades desse VP, sem necessariamente estarem associadas à MVP (Fig. 4.2.5b). Em alguns casos, no mesmo vacúolo, foi possível observar mitocôndrias associadas diretamente à MVP ou estabelecendo esse contato mediado pelo RE, inclusive com formação de pequenas vesículas entre tais organelas (Fig. 4.2.5c), como visualizado em detalhe na figura 4.2.5d.

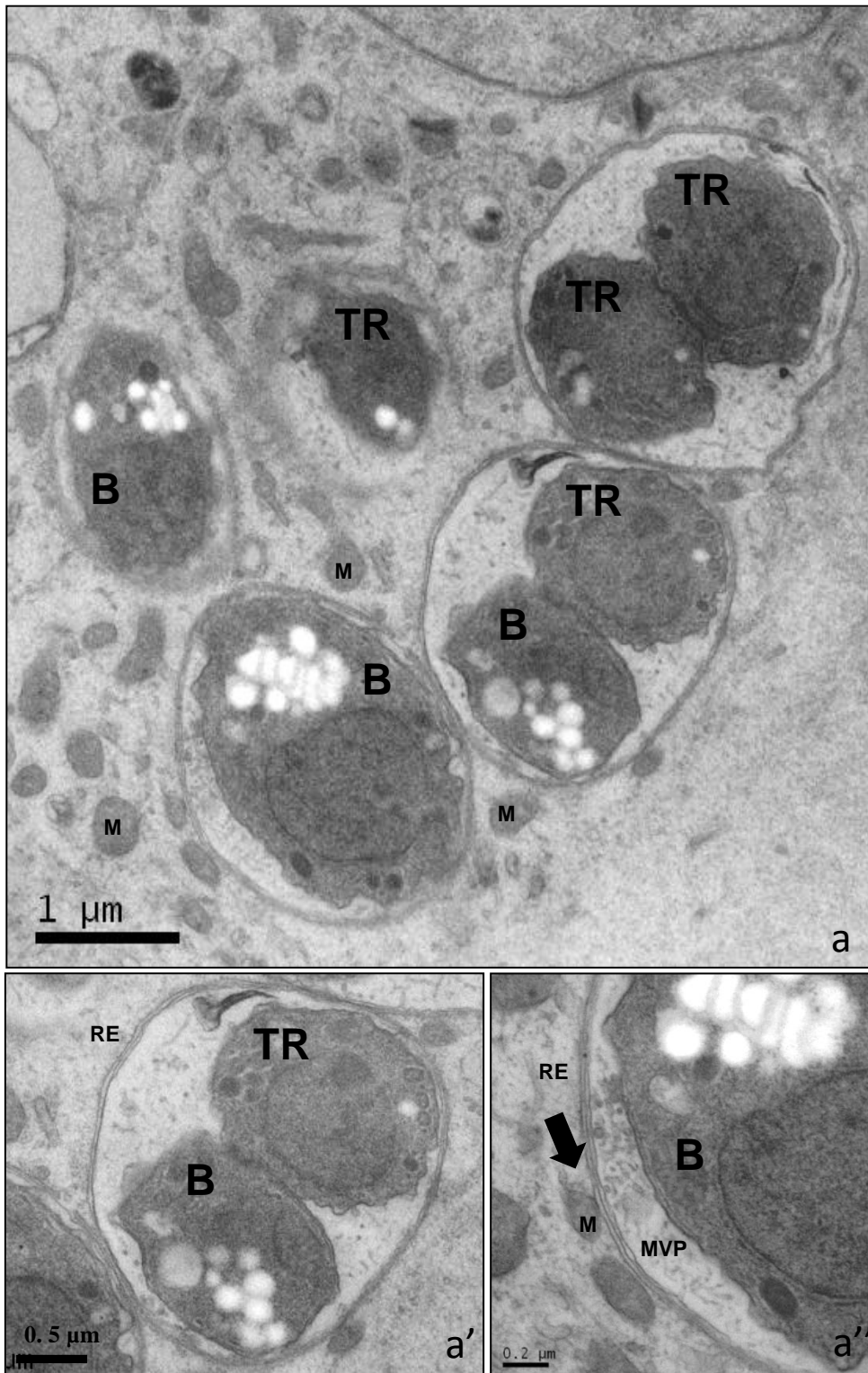


Figura 4.2.2a-a'': Análise ultraestrutural da interação de bradizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* e a célula hospedeira, após 72 h de infecção. CME com múltiplos vacúolos parasitóforos (VP), contendo número variável de parasitos, com bradizoítos (B) (a); alguns VP apresentam bradizoítos e formas em transição (TR) (a'); ocorrência de estreitas associações (seta larga) entre mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático (RE) com a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (a'').

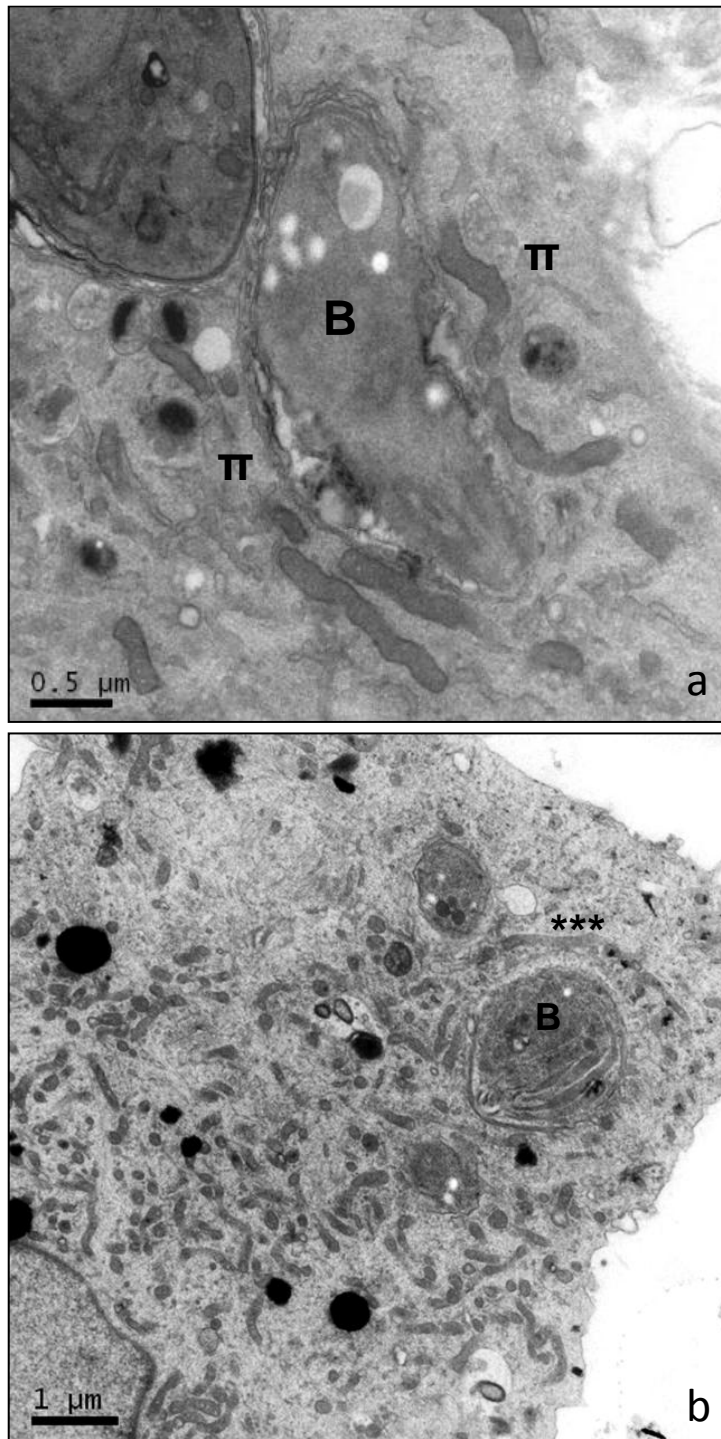


Figura 4.2.3a-b: Modificação da organização e distribuição das mitocôndrias nas células infectadas observadas por MET, após 72 h de infecção. CME contendo VP com um único bradizoíto apresentando as mitocôndrias ainda em um padrão de distribuição e uma organização do tipo paralela ao eixo longitudinal celular (π) (a); outra célula contendo VP com um único bradizoíto começando a modificar o padrão de organização das mitocôndrias para radial (*) (b).**

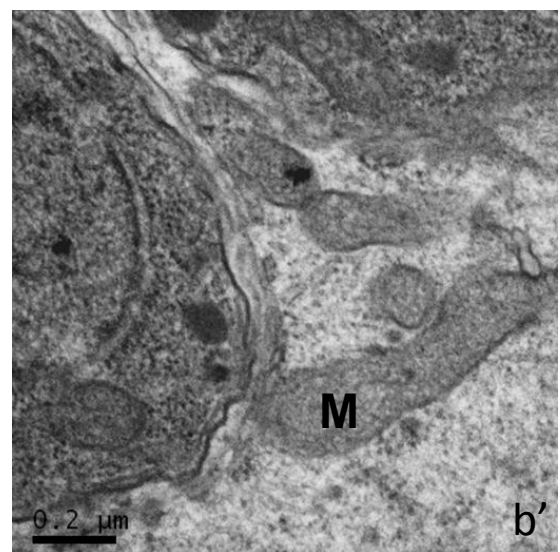
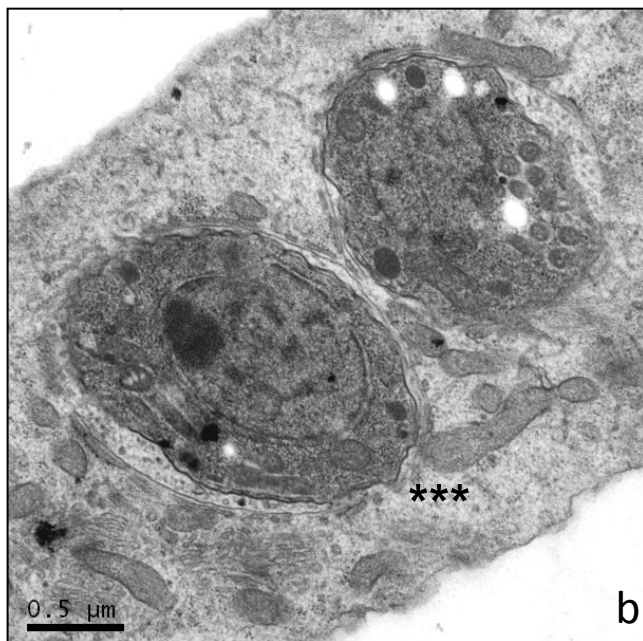
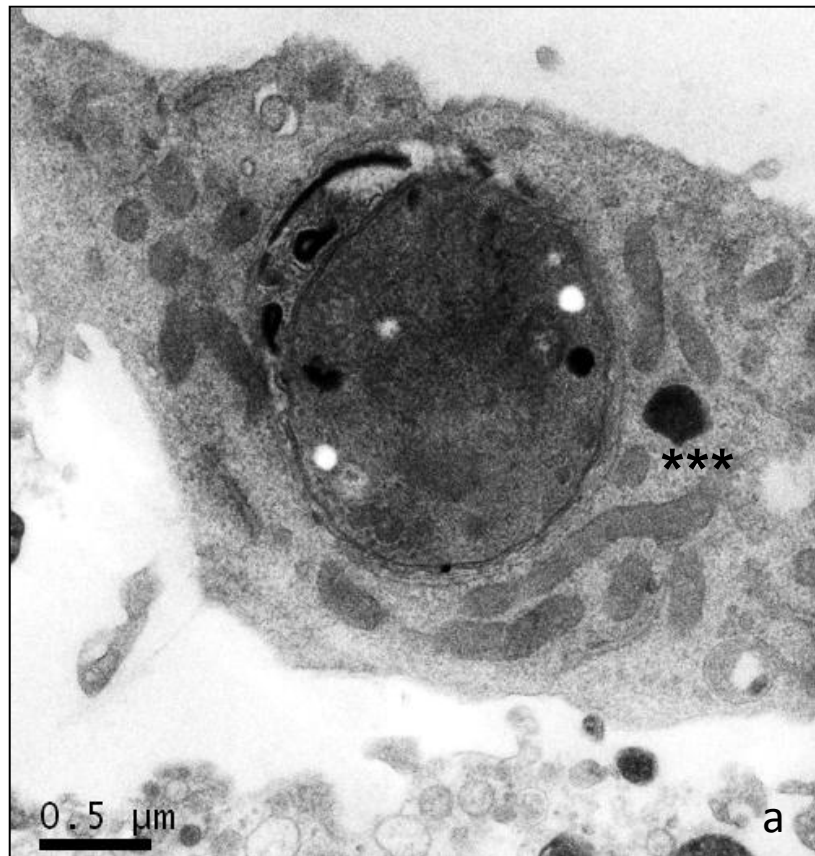


Figura 4.2.4a-b': Padrão radial de organização e distribuição das mitocôndrias nas células infectadas observadas por MET, após 72 h de infecção. CME contendo VP com um bradizoíto (b) apresentam as mitocôndrias (M) em um novo padrão de distribuição e uma organização do tipo radial (*) em torno do VP (a-b); detalhe do padrão radial determinado pelas associações entre mitocôndrias e a MVP (b') TR – forma em transição.**

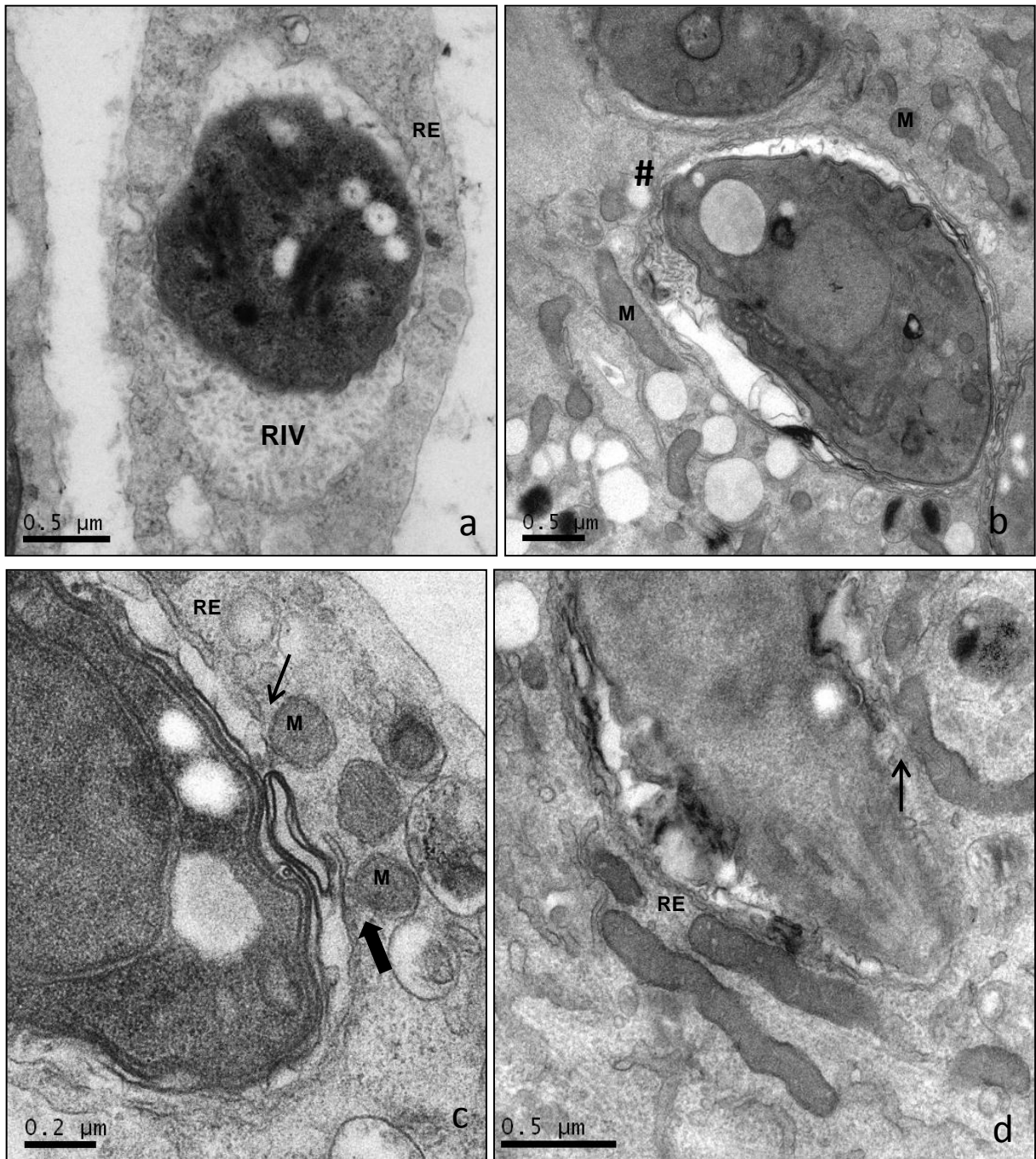


Figura 4.2.5a-d: Aspectos da interação de VP, por MET, contendo um bradizoóito (B), com a CME, após 72 h de infecção. Rede Túbulo Vesicular (RTV) bem desenvolvida e o VP circundado pelo RE (a); síntese da RTV a partir do poro posterior (#) e mitocôndrias (M) ao redor do VP (b); associações direta (seta fina) e indireta (seta larga) de mitocôndrias com a MVP (c); detalhe de evidentes associações diretas e indiretas de mitocôndrias com o VP (d).

O retículo endoplasmático rugoso (RER) foi observado em associação com a MVP por meio da sua face lisa, estando desta forma a face rugosa voltada para o citoplasma da célula hospedeira (Fig. 4.2.6a). Essa associação do RER não é contínua, demonstrando claramente que vários perfis circundam o VP, deixando desnudas algumas áreas da MVP (Fig. 4.2.6a-b). Muitas vezes, mitocôndrias foram localizadas nessas áreas desprovidas de RER interagindo diretamente com a MVP (Fig. 4.2.7a, a', b, c). Perfis de retículo endoplasmático liso (REL) foram comuns de serem observados em íntimo contato com a MVP (Fig. 4.2.8a) e a presença de mitocôndrias associadas ao REL (Fig. 4.2.8 b, b'; 4.2.9a), mediando essa interação, como visto em detalhe na figura 4.2.9a'.

Alguns outros aspectos destas interações MVP e organelas apontaram que durante a divisão celular de bradizoítos, a endodiogenia, ocorre uma alta síntese da rede túbulo vesicular e uma clara associação de mitocôndrias no sítio de comunicação entre as RTV e a MVP (Fig. 4.2.10a, a'; 4.2.11a, a', a'', a'''), mediadas ou não pelo RER (Fig. 4.2.12 a, b).

Formas em transição entre bradizoítos e taquizoítos no interior do VP apresentaram associação da MVP com RER, além de mitocôndrias em contato direto com a MVP ou mediadas pelo RER (Fig. 4.2.13a, b, b'). Uma série de imagens do estágio de transição em CME mostrou grande diversidade de interações via RER-mitocôndria (Fig. 4.2.14a-c''). Eventualmente, foram observadas imagens mostrando a interação de mitocôndria simultaneamente com RER e a MVP (Fig. 4.2.15a), enquanto grupos de mitocôndrias estabeleceram contatos diretos e indiretos com RER e MVP (Fig. 4.2.15b). Outro evento observado várias vezes, foi a presença de vacúolos contendo formas em transição que se conectavam através de uma única mitocôndria via RER ou diretamente na MVP (Fig. 4.2.16 a, b; 4.2.17 a, b).

As áreas de contato direto entre as mitocôndrias e a MVP mostraram grande quantidade de vesículas tanto no interior do VP quanto na região externa, correspondente ao citoplasma da célula hospedeira (Fig. 4.2.18 a, b, b' e 4.2.19 a, b).

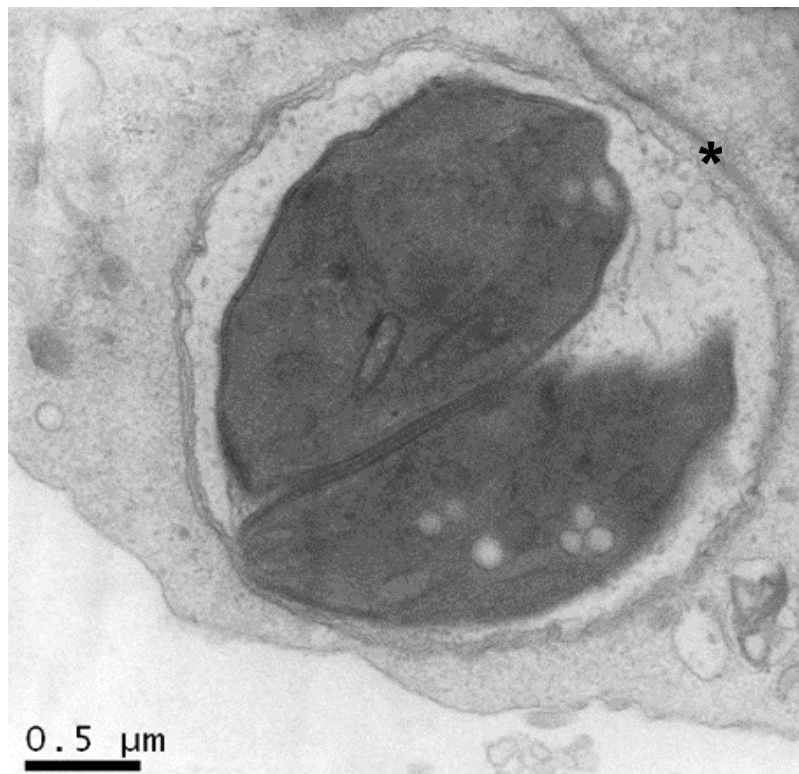
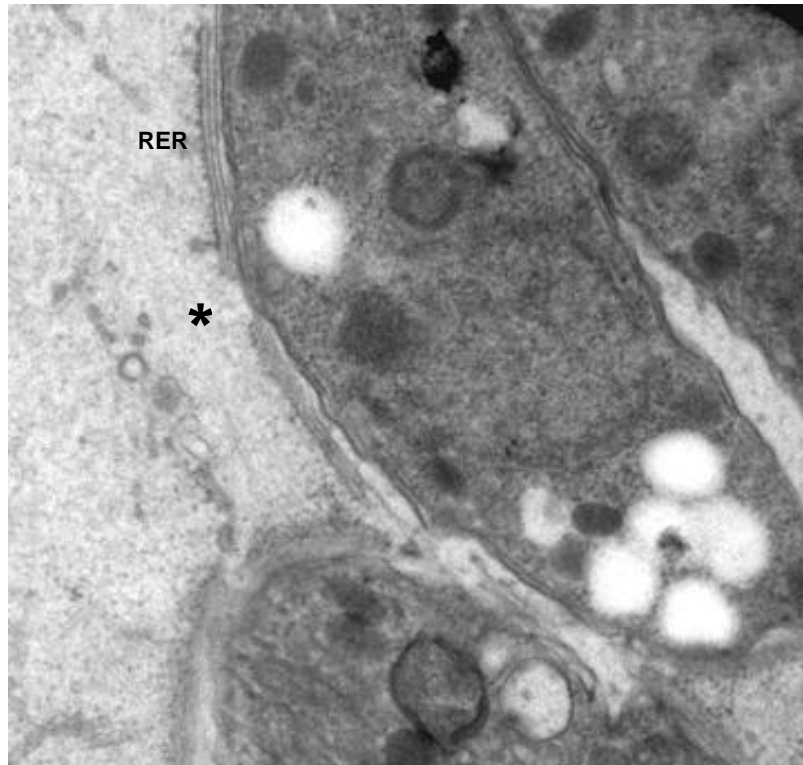


Figura 4.2.6a-b: Peculiaridades da associação do retículo endoplasmático rugoso (RER) de CME com a MVP observadas por MET. Observa-se a orientação específica do RER com uma face lisa voltada para o VP e a outra face com muitos ribossomos voltada para o citoplasma da CME. Descontinuidade (*) do RER no envoltório do VP (a) e (b). Nota-se a RIV rarefeita (b).

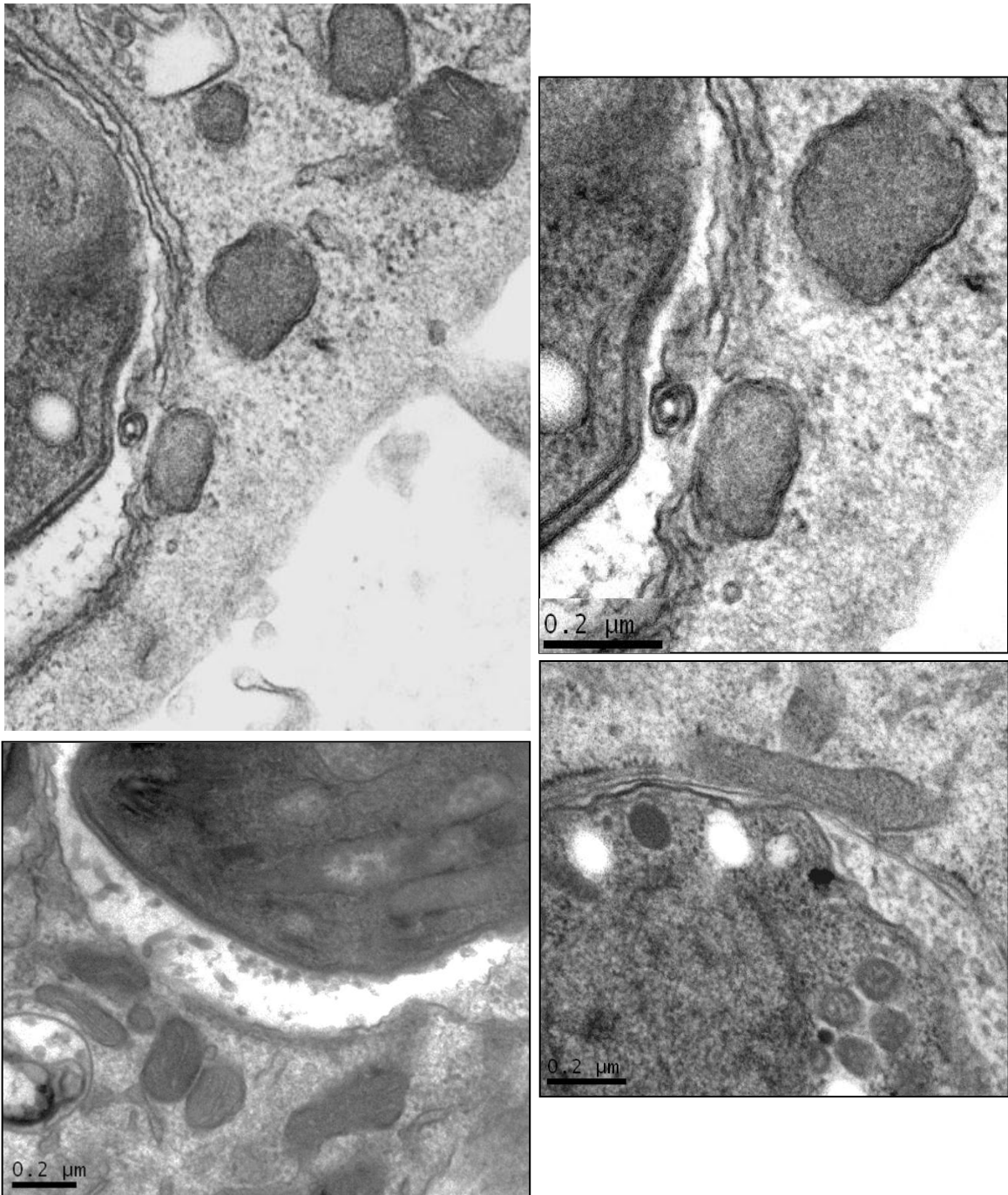


Figura 4.2.7a-c: Detalhes por MET de associações diretas entre mitocôndrias de CME e VP contendo bradizoitos (B), após 72 h de infecção. Mitocôndria em associação direta (seta fina) com a MVP (a); aumento que permite melhor visualização das membranas do VP e da mitocôndria (a'); mitocôndria diretamente associada à MVP em uma área desnuda de RE (b); mitocôndria em associação com a MVP numa região entre duas cisternas de RER (c).

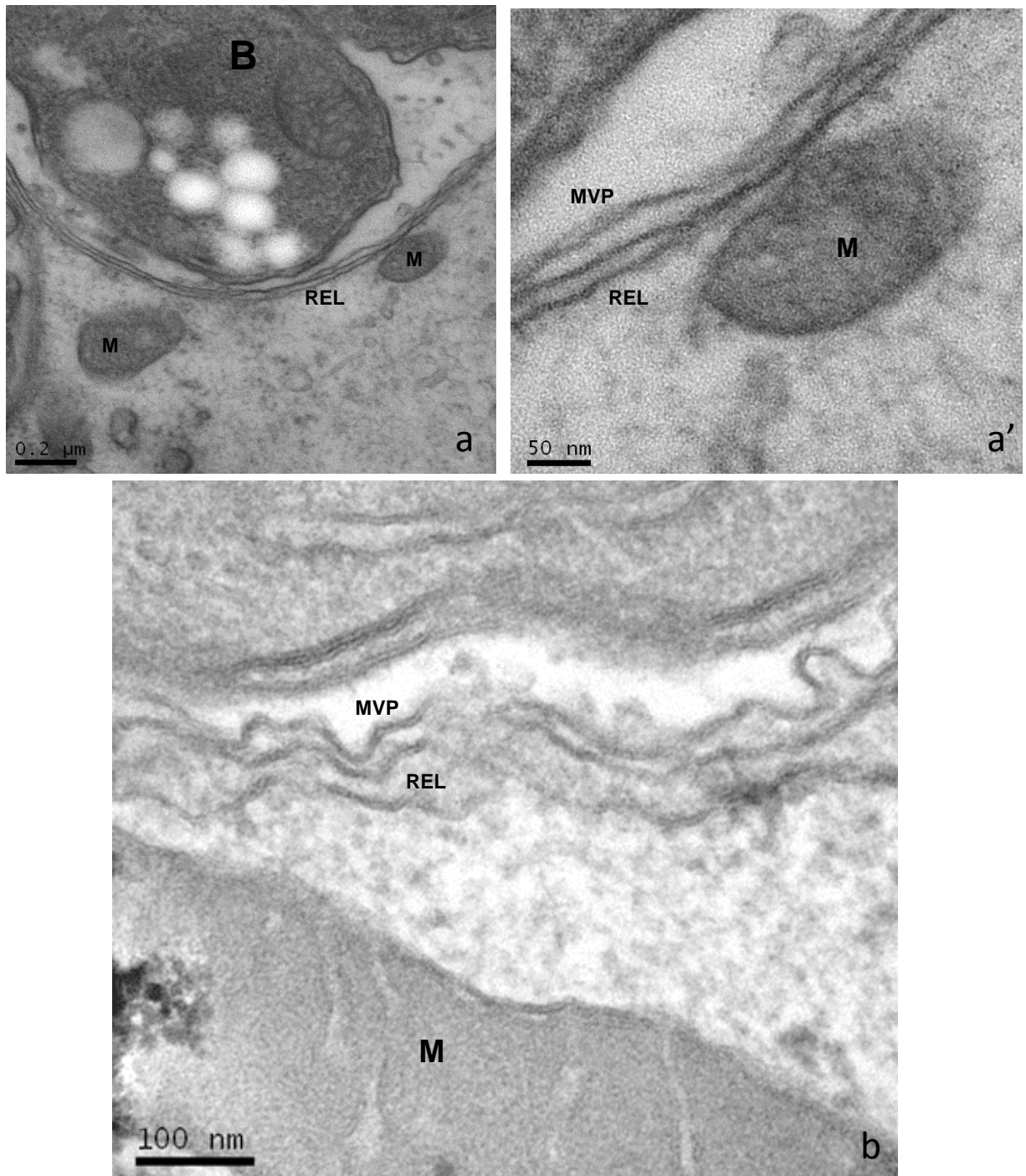


Figura 4.2.8a-b: Associação do VP, contendo bradizoíto (B), com o retículo endoplasmático liso (REL) de CME observada por MET, após 72 h de infecção. Envolvimento do VP pelo REL (a); associação entre mitocôndria (M) e MVP mediada pelo REL (seta larga) (a'); detalhe que apresenta um perfil de REL (ausência de ribossomos) intimamente associado à MVP (b).

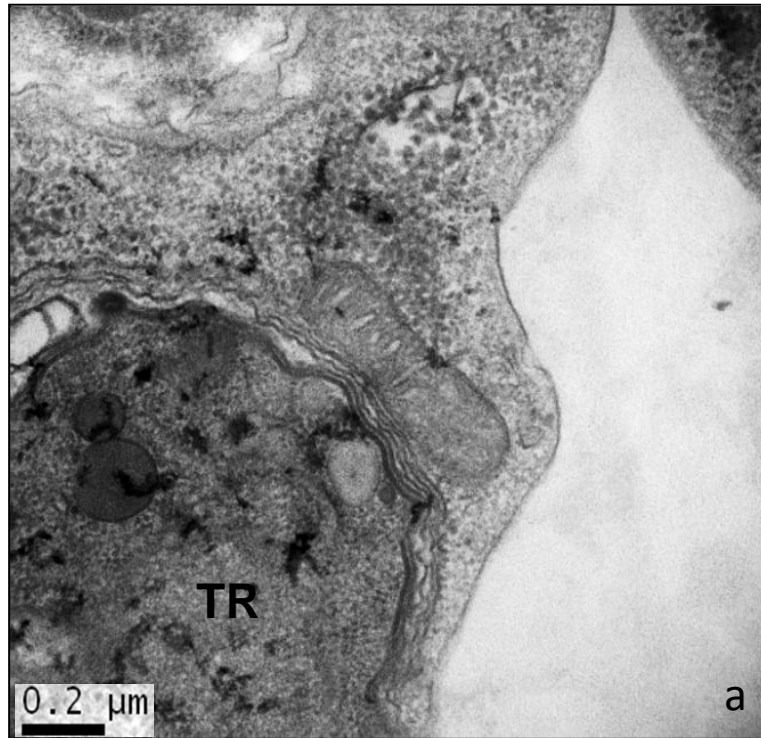


Figura 4.2.9a-a': Associação do VP, contendo forma em transição (TR), com o retículo endoplasmático liso (REL) de CME, observada por MET, após 72 h de infecção. Envolvimento do VP pelo REL, que faz mediação entre a mitocôndria (M) e a MVP (seta larga) (a).

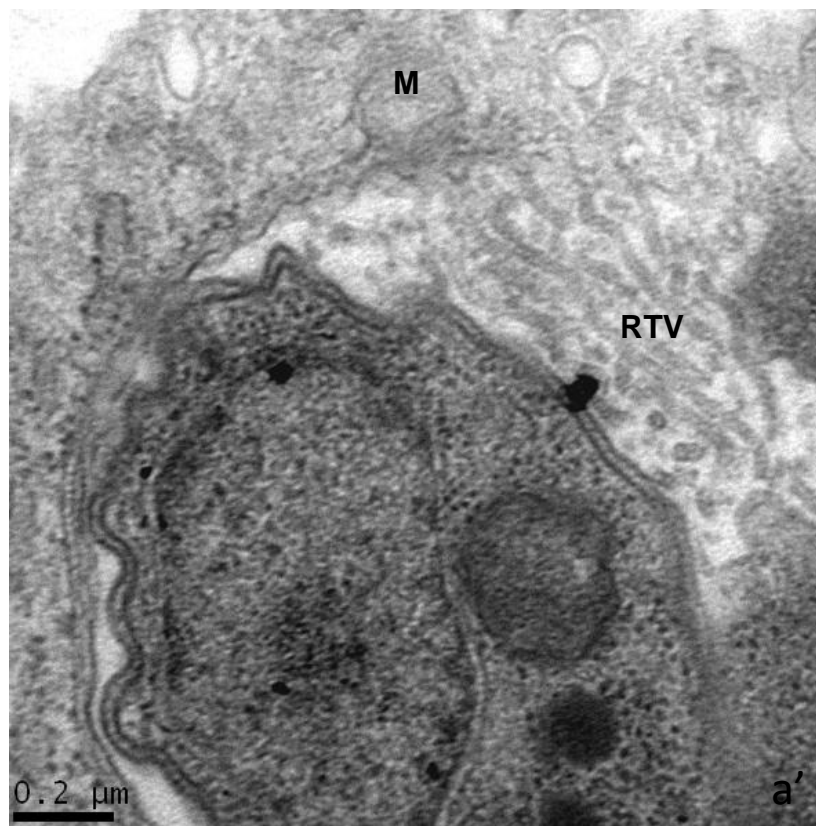
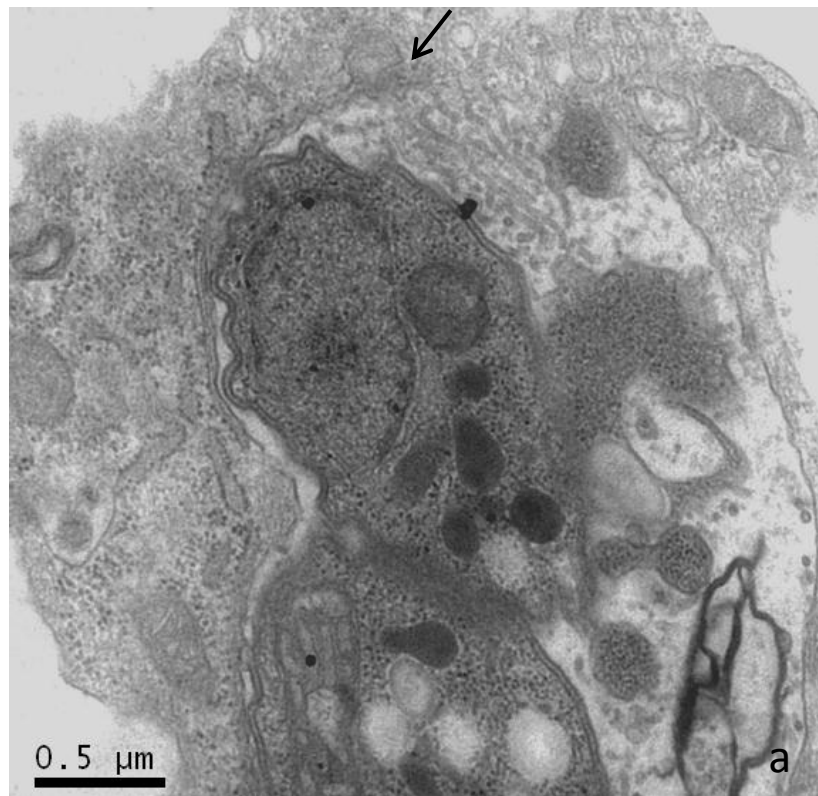


Figura 4.2.10a-a': Produção da RTV por bradizoitos em divisão observada por MET. Imagem de VP contendo bradizoitos (B) em divisão, sugerindo a síntese de RTV em área subjacente à associação direta (seta fina) entre uma mitocôndria (M) e a MVP (a); detalhe em maior aumento da RTV em região de íntimo contato mitocôndria-MVP (a').

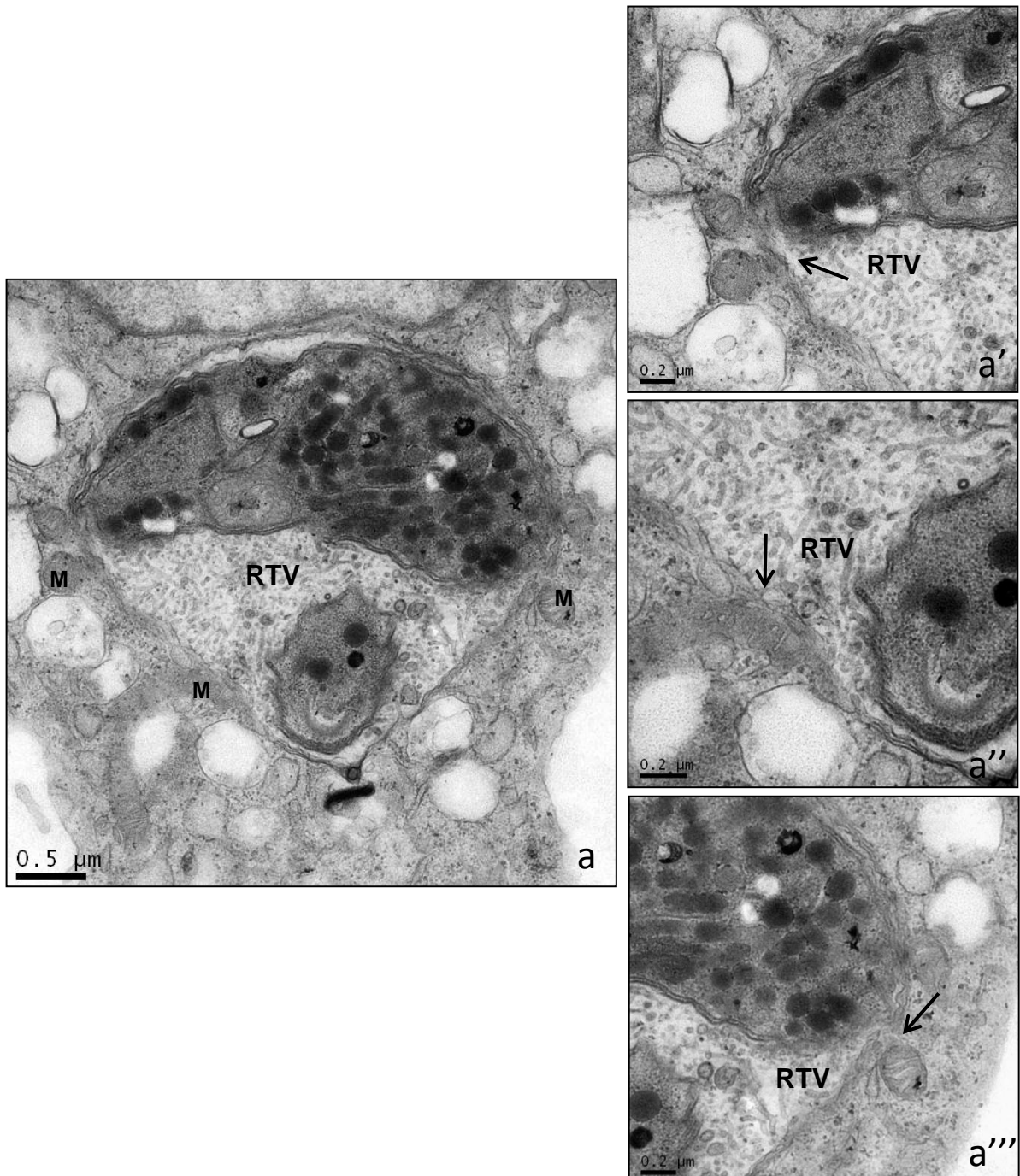


Figura 4.2.11a-a''': Produção da RIV por bradizoitos em divisão observada por MET. Imagem de VP contendo bradizoitos em divisão com o espaço intravacuolar repleto de RIV. Algumas regiões da MPV associadas diretamente (seta fina) com mitocôndria (M) (a); detalhes sugestivos de síntese da RIV em regiões de íntimo contato mitocôndria-MVP (a'-a''').

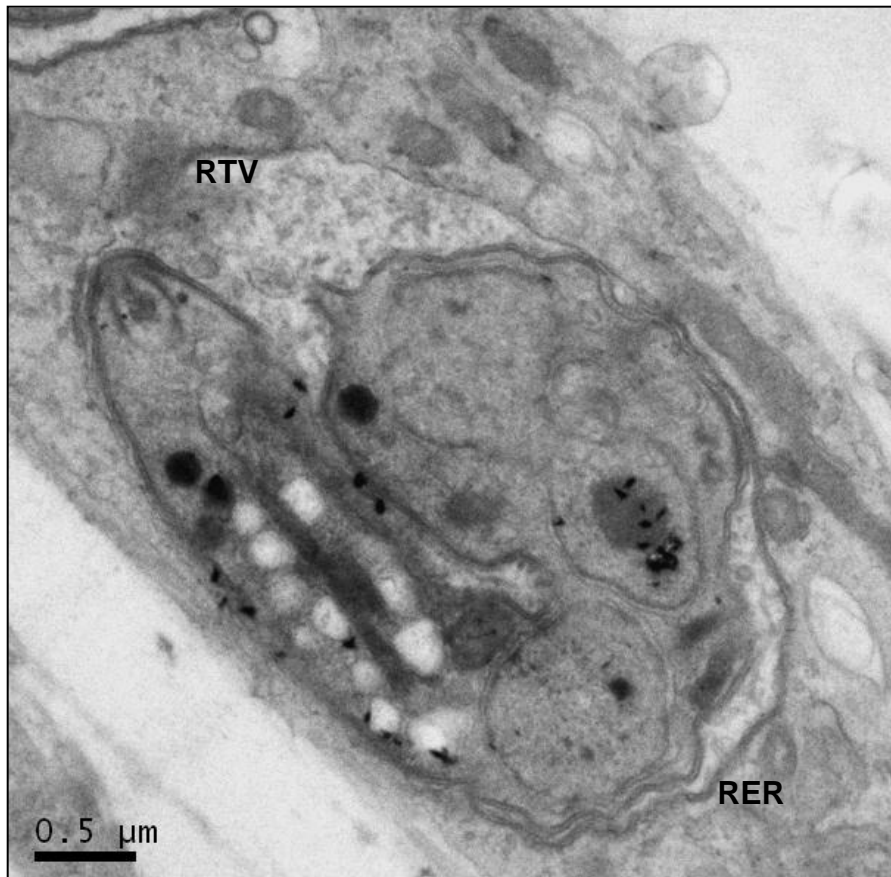


Figura 4.2.12: Produção da RTV por bradizoíto em divisão observada por MET em CME, após 144 h de infecção. Imagem de VP contendo bradizoíto (B) em divisão, sugerindo a síntese de RIV em área subjacente à região de associação entre uma mitocôndria (M) e a MVP.

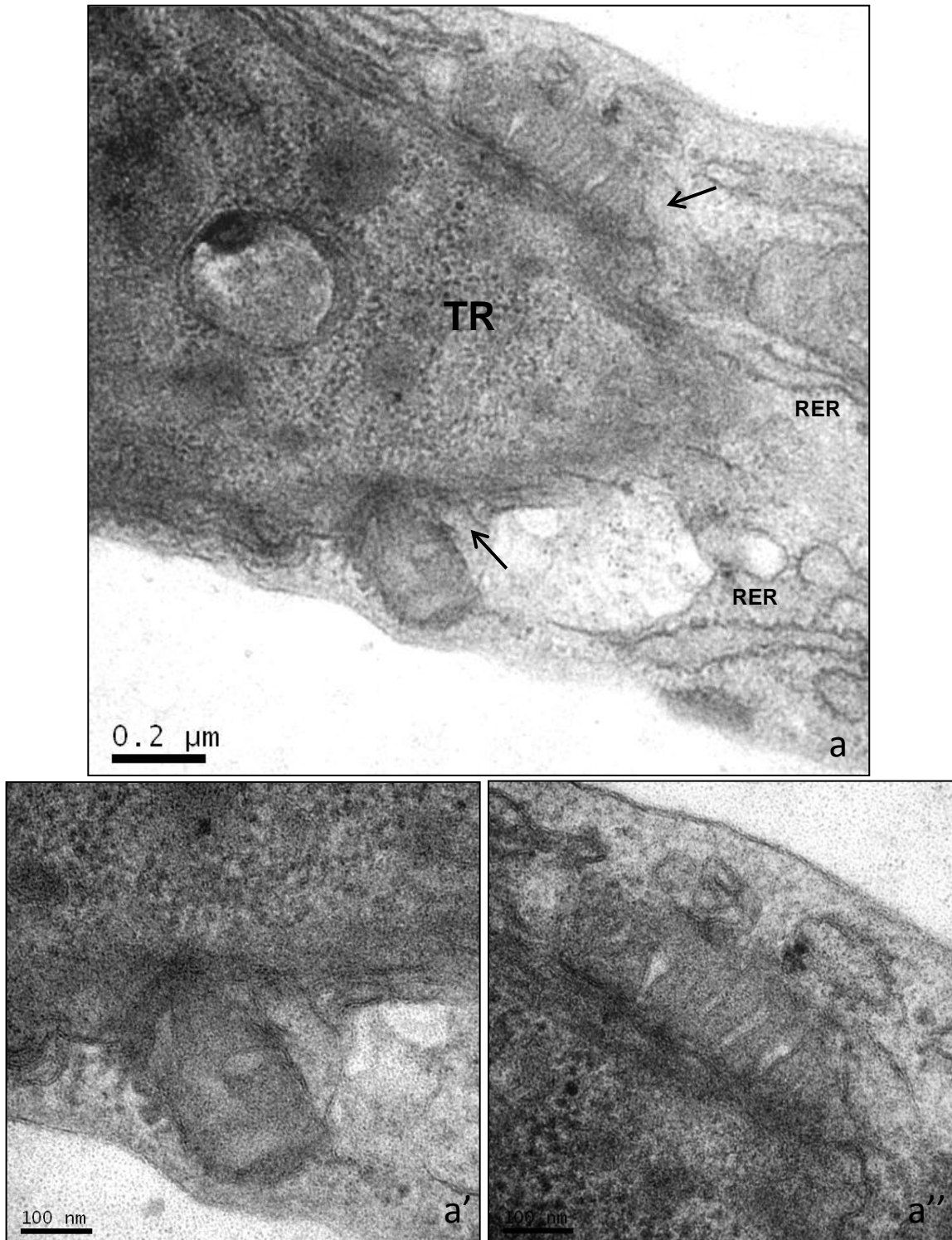


Figura 4.2.13a-a'': VP contendo forma em transição em associação direta com mitocôndrias de CME observada por MET. Imagem de VP contendo formas em transição em associação direta (seta fina) com mitocôndrias e RER, sem estar associado ao VP, apresentando as duas faces da cisterna rugosas (a); detalhe das membranas do VP e da mitocôndria em associação direta (a'); outra associação íntima entre as membranas do VP e da mitocôndria (a'').

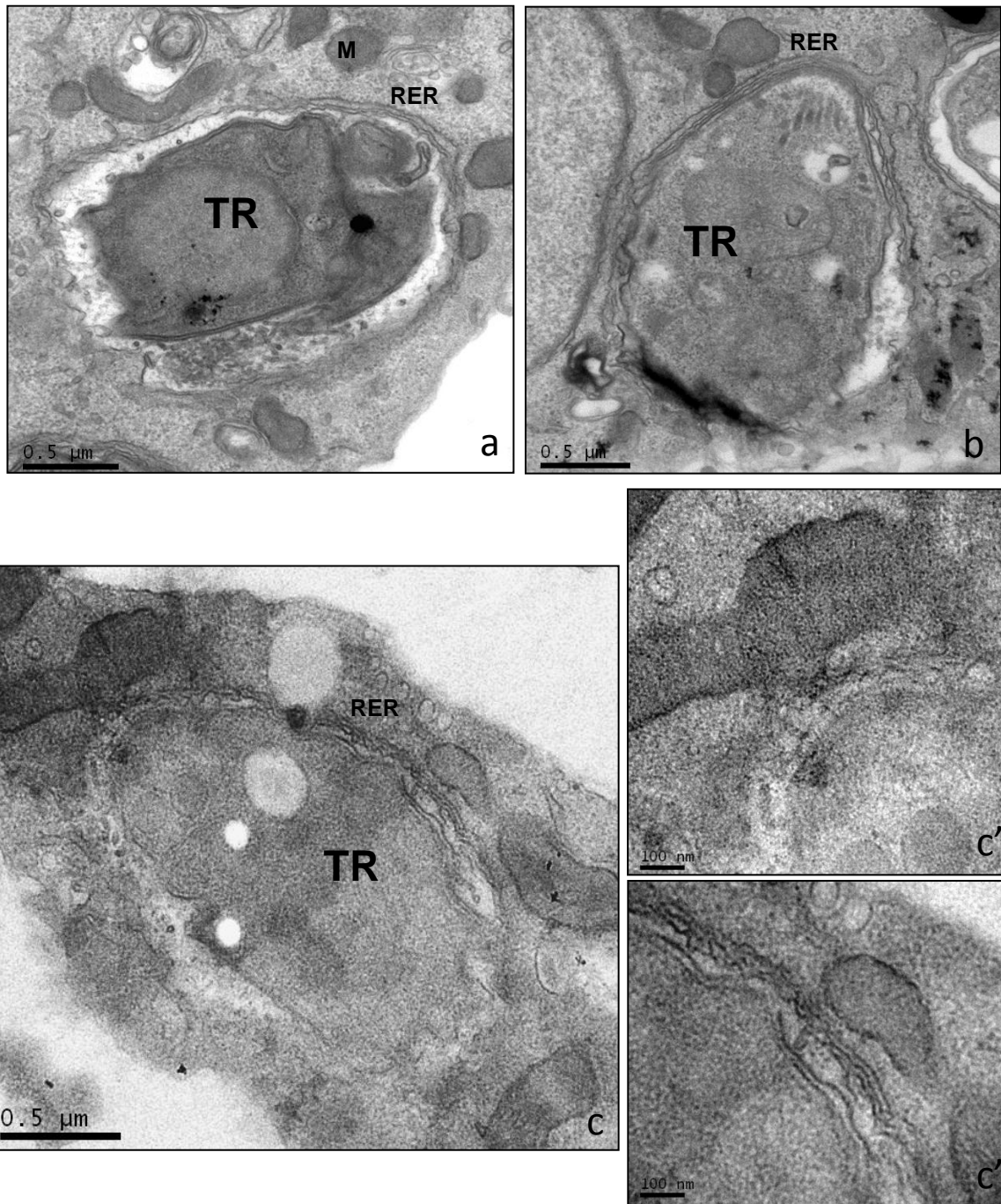


Figura 4.2.14a-c'': VP contendo forma em transição em associação indireta com mitocôndrias de CME observado por MET. VP contendo forma em transição (TR) envelopado pelo RER e circundado por mitocôndrias (M) (a); VP contendo forma em transição (TR) com associação indireta entre mitocôndria e MVP mediada pelo RER (seta larga) (b); VP contendo forma em transição (TR) envelopado pelo REL (retículo endoplasmático liso) e circundado por mitocôndrias (c); detalhe da associação indireta entre mitocôndria e MVP mediada pelo REL (seta larga) (c'); detalhe de outra associação indireta entre mitocôndria e MVP mediada pelo REL (seta larga) (c'').

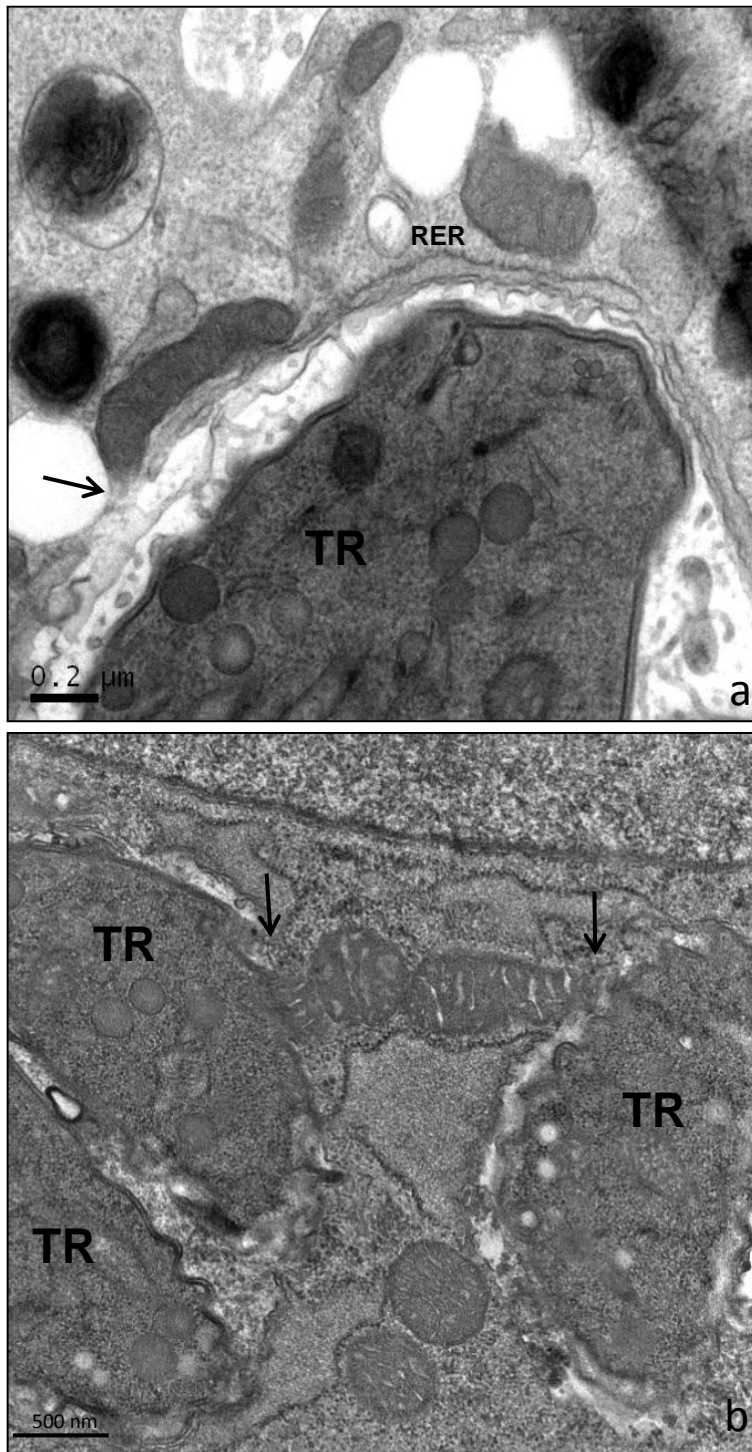


Figura 4.2.15a-b: VP contendo forma em transição em associações mistas com mitocôndrias de CME observado por MET, após 72 h de infecção. VP contendo forma em transição (TR), envelopado pelo RER, apresentando associação direta (setas finas) e indireta (setas largas) com a mesma mitocôndria (associação mista) (a); dois outros VP contendo formas em transição (TR), envelopados pelo RER, apresentando associações diretas (setas finas) e indiretas (setas largas) com mitocôndrias (M) (b).

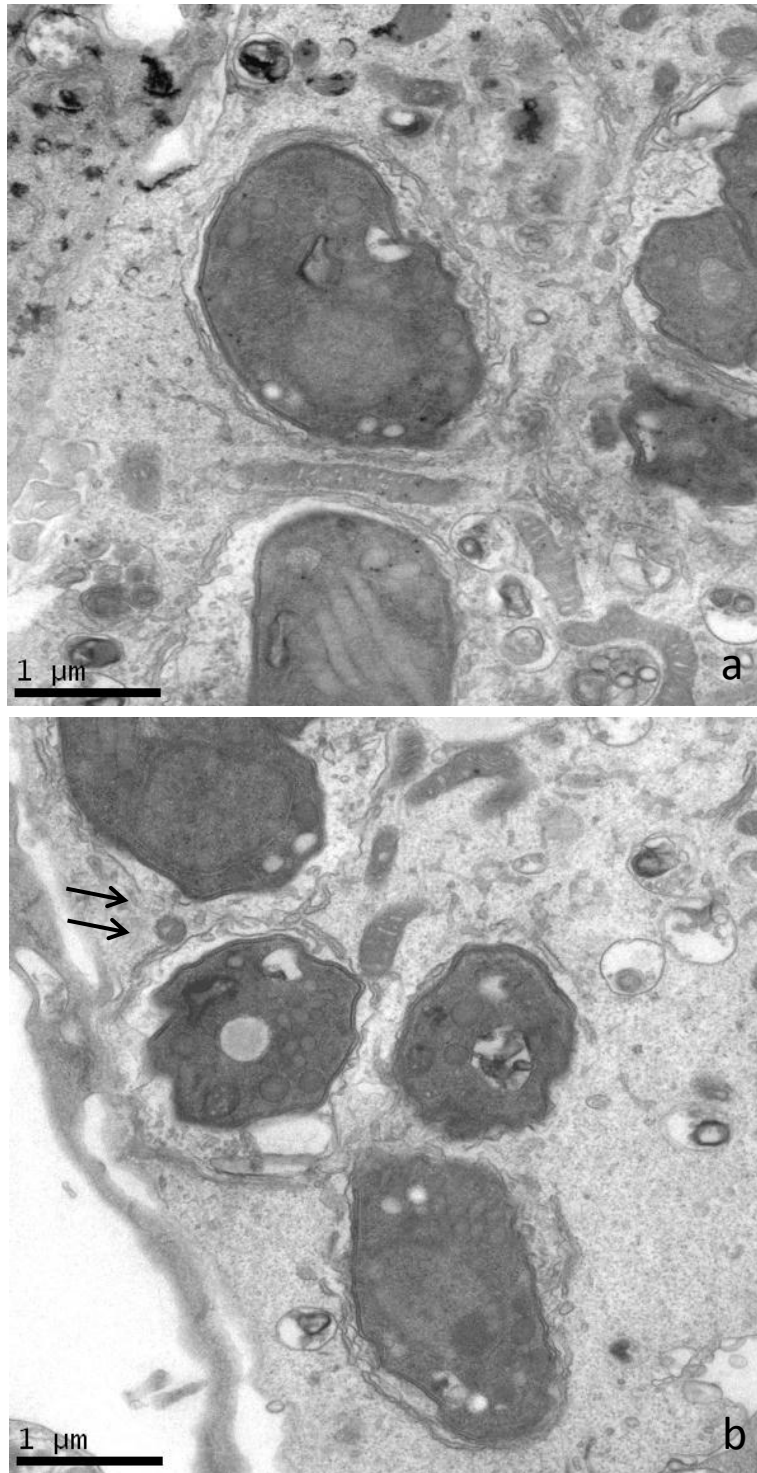


Figura 4.2.16a-b: Mitocôndrias de CME em associação indireta com mais de um VP contendo formas em transição observada por MET, após 7 dias de infecção. Mitocôndria em associação indireta (setas largas) com mais de um VP contendo formas em transição (TR), envelopado pelo RER (a); outra célula apresentando mitocôndria em associação direta (setas finas) com MVP em mais de um VP contendo formas em transição (TR), com áreas cobertas pelo RER (b).

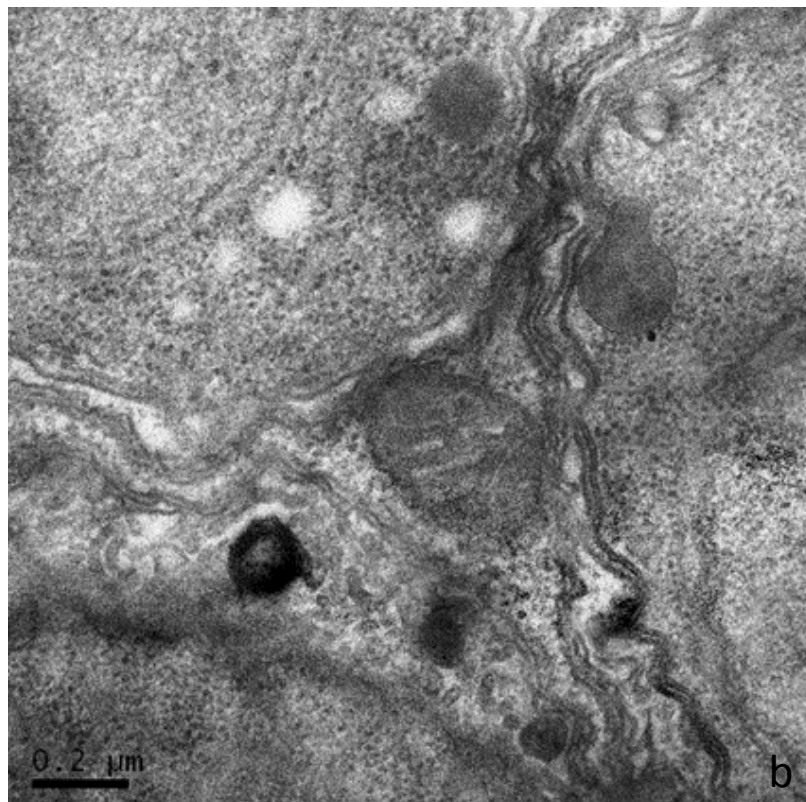
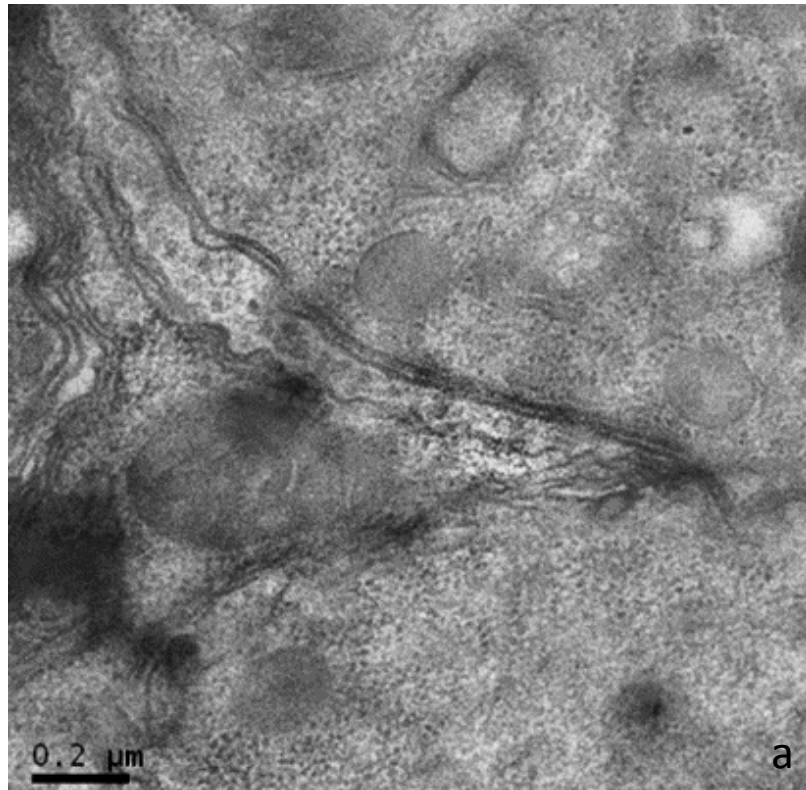


Figura 4.2.17a-b: Mitocôndrias de CME em associação indireta com mais de dois VP contendo formas em transição observada por MET. Mitocôndria (M) em associação indireta com mais de dois VP contendo formas em transição (TR), envelopado pelo RER (a); outra célula apresentando mitocôndria em associação indireta com mais de dois VP contendo formas em transição (TR), envolvido pelo RER (b).

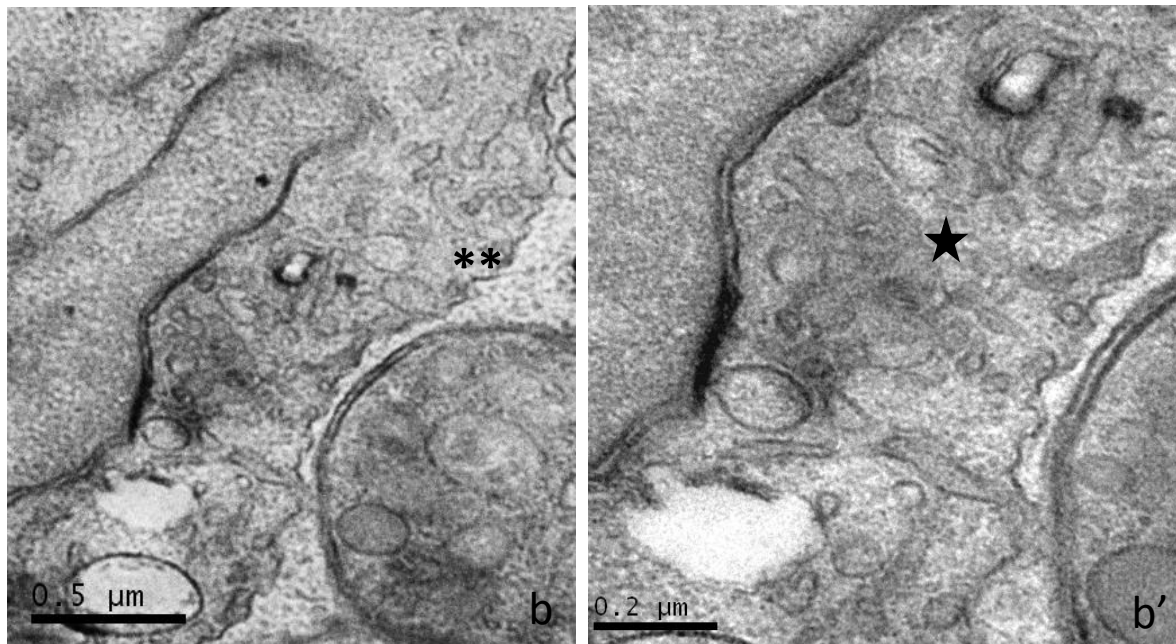
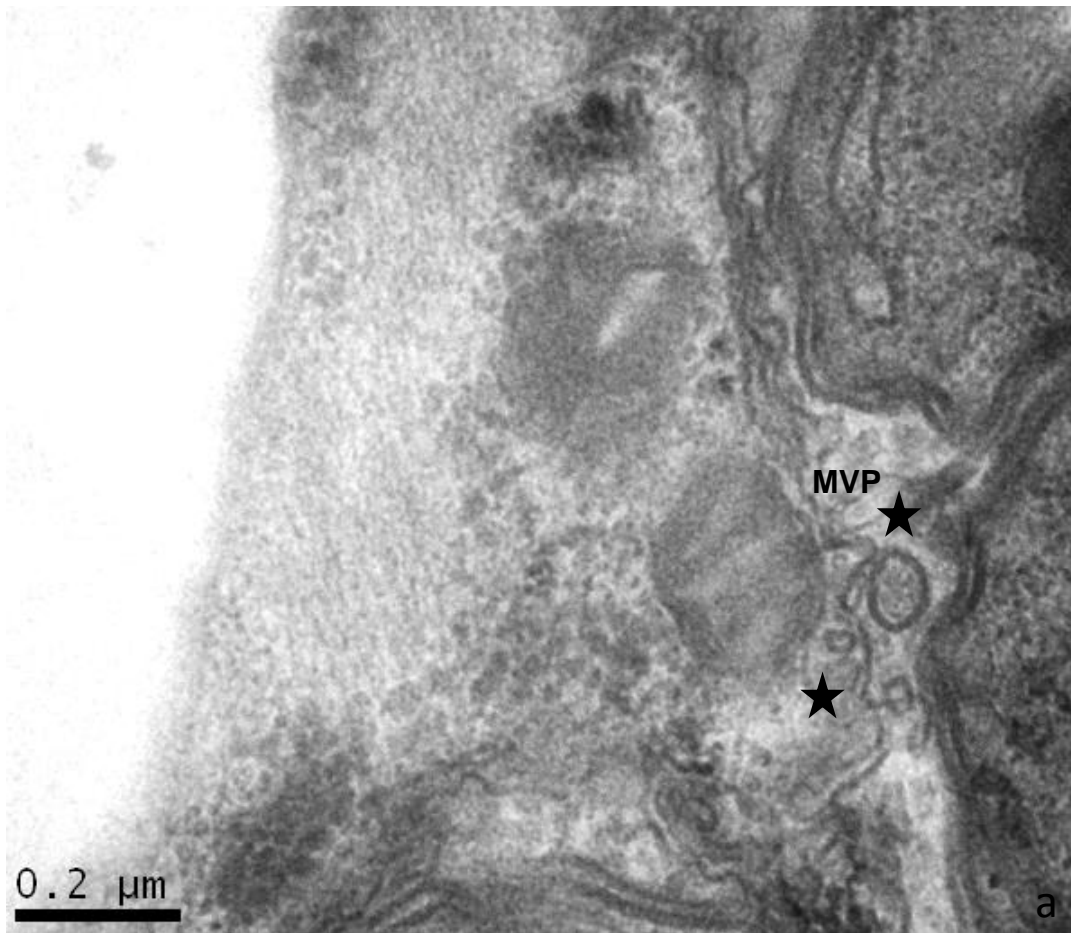


Figura 4.2.18a-b': Intensa vesiculação na área de interação mitocôndria-MVP e invaginação da MVP observada por MET em CME, após 7 dias de infecção. Vesículas (estrela) podem ser vistas no interior do VP e no citoplasma da CME, na área próxima à associação mitocôndria-MVP (a); célula apresentando VP com MVP invaginada (**) (b); aumento permitindo melhor visualização de sugestivo tráfego de vesículas na interface mitocôndria-MVP (b').

Vacúolos parasitóforos que continham formas taquizoítas da cepa ME-49, produto da conversão de bradizoítos, durante a fase de proliferação, apresentavam RTV bem desenvolvida e associação de mitocôndrias à MVP mediada pelo RER justo nesta área (Fig. 4.2.20 a). Células com vacúolos contendo vários parasitos exibiam uma RTV típica na matriz vacuolar e associação de mitocôndrias diretamente à MVP ou mediada pelo RER (Fig. 4.2.20b; 4.2.21 a, b).

Um fato que nos chamou a atenção foi a evidenciação do íntimo contato entre vacúolos parasitóforos contendo um ou mais parasitos, algumas vezes com interdigitações das suas membranas (Fig. 4.2.22 a-c). Esse contato se estabelecia entre dois, três ou mais vacúolos simultaneamente (Fig. 4.2.22 d). Este evento foi mais comum em células que continham muitos vacúolos, porém nem todos apresentavam conexão (Fig. 4.2.22 a-d; 4.2.23a, a'). Sucessivas imagens mostravam que, além da interdigitação entre as MVP, ocorriam, ainda, áreas que sugeriam quebra ou rompimento dessas membranas, permitindo a comunicação entre quatro vacúolos dentre os oito vacúolos presentes na CME, como por exemplo, visto na figura 4.2.23a. Nota-se que essas “comunicações” eram estabelecidas entre vacúolos contendo formas bradizoítas e em transição, como pode ser bem observado em detalhe na figura 4.2.23a'. Algumas outras imagens desses eventos com interação entre vacúolos contendo bradizoítos são mostradas adicionalmente (Fig. 4.2.24 a, b).

Um dado que merece ser citado foi a observação de vacúolos contendo parasitos em avançado processo de morte celular que mantinham a associação de mitocôndrias e RER com a MVP (Fig. 4.2.25a, a').

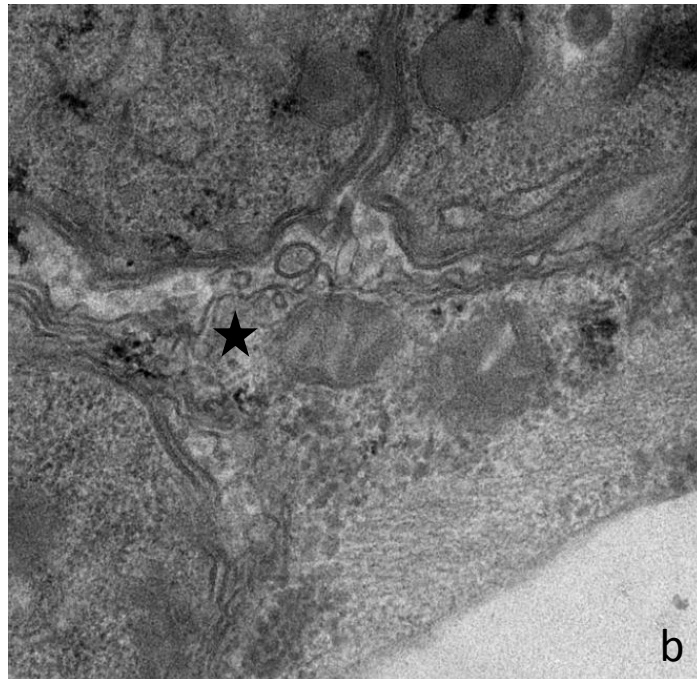
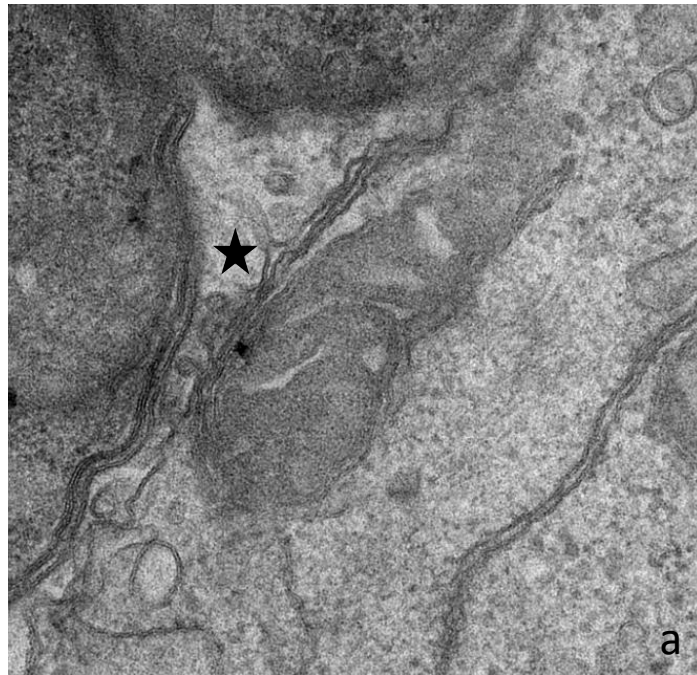


Figura 4.2.19a-b: Intensa vesiculação na área de interação mitocôndria-MVP observada por MET em CME, após 144 h de infecção. Concentração de pequenas vesículas (estrelas) no interior do VP próximo à associação mitocôndria-MVP (a); célula apresentando VP com MVP invaginada e concentrando vesículas no interior e no exterior no VP, na zona de interação com a mitocôndria (b).

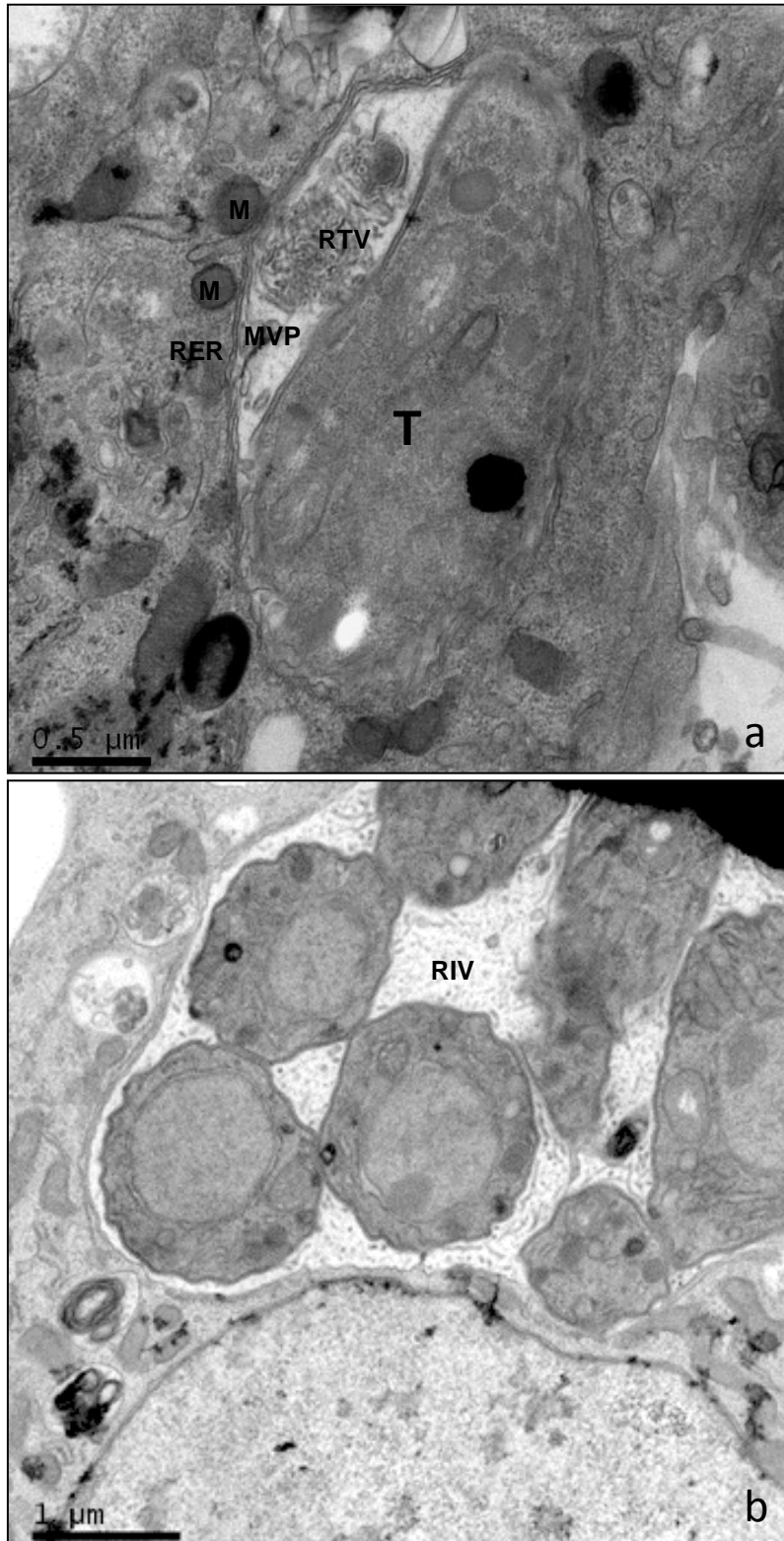


Figura 4.2.20a-b: Associação de mitocôndria de CME mediada pelo RER com VP contendo tachizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* observado por MET, após 144 h de infecção. VP contendo tachizoíto (T) em associação com mitocôndria, mediada pelo RER (seta larga) (a); CME apresentando VP com vários parasitos em transição (TR), envolvido pelo RE e com várias associações diretas e indiretas com mitocôndrias. Nota-se a RIV rarefeita (b).

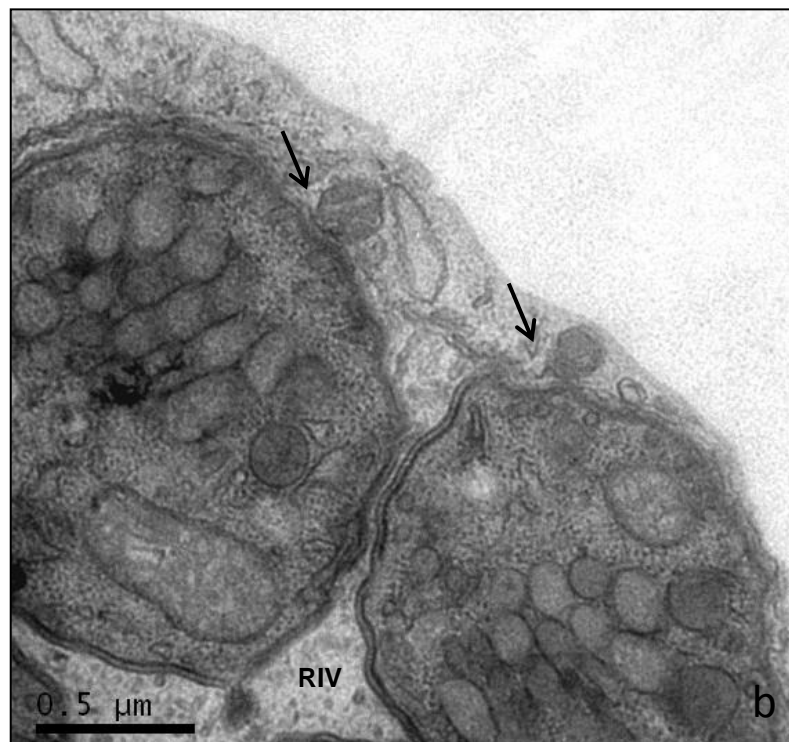
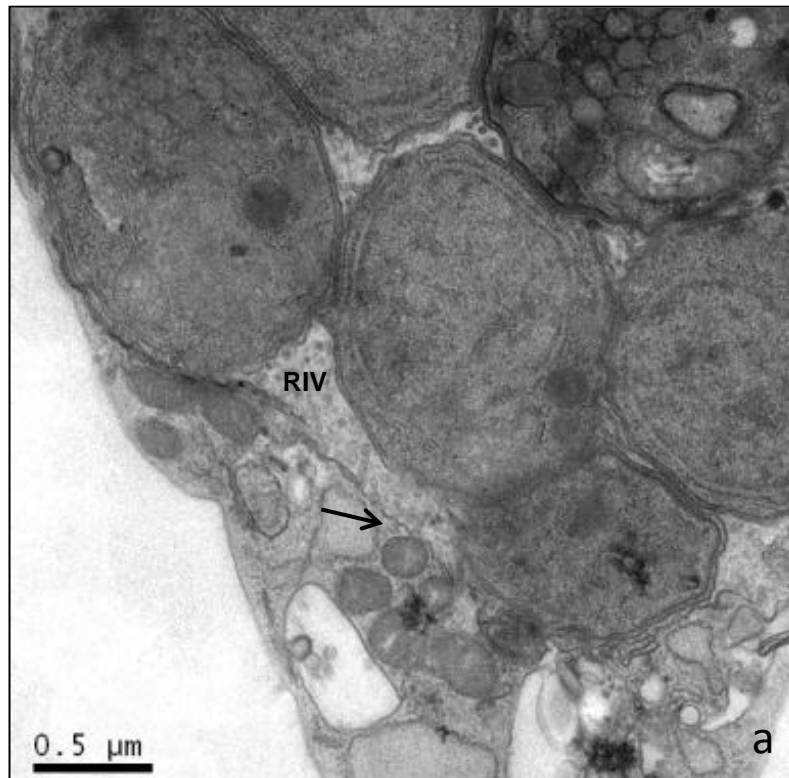


Figura 4.2.21a-b: VP com vários parasitos em associação direta com mitocôndria observado por MET. CME apresentando VP com vários parasitos em transição, envolvido pelo RE e com associação direta (seta fina) com mitocôndrias (a); outro VP com parasitos em transição demonstrando a recorrência das associações diretas (setas finas) entre mitocôndrias e MVP nesses VP múltiplos (b). Nota-se a RIV rarefeita.

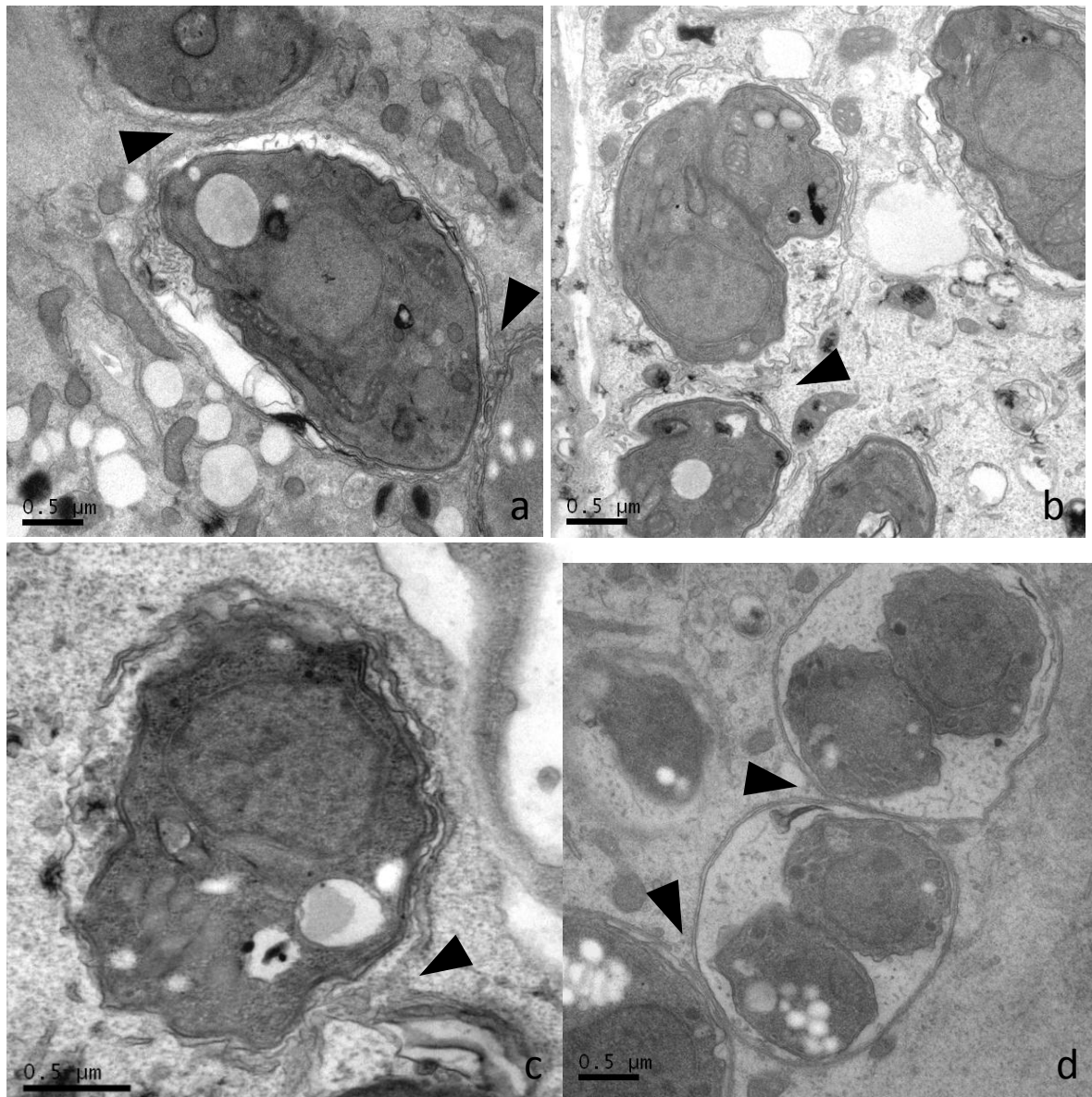


Figura 4.2.22a-d: Comunicação entre VP observada por MET em CME, após 144 h de infecção. Diferentes cortes de diferentes células que apresentam VP com diferentes formas infectivas em comunicação (cabeças de seta) (a-d).

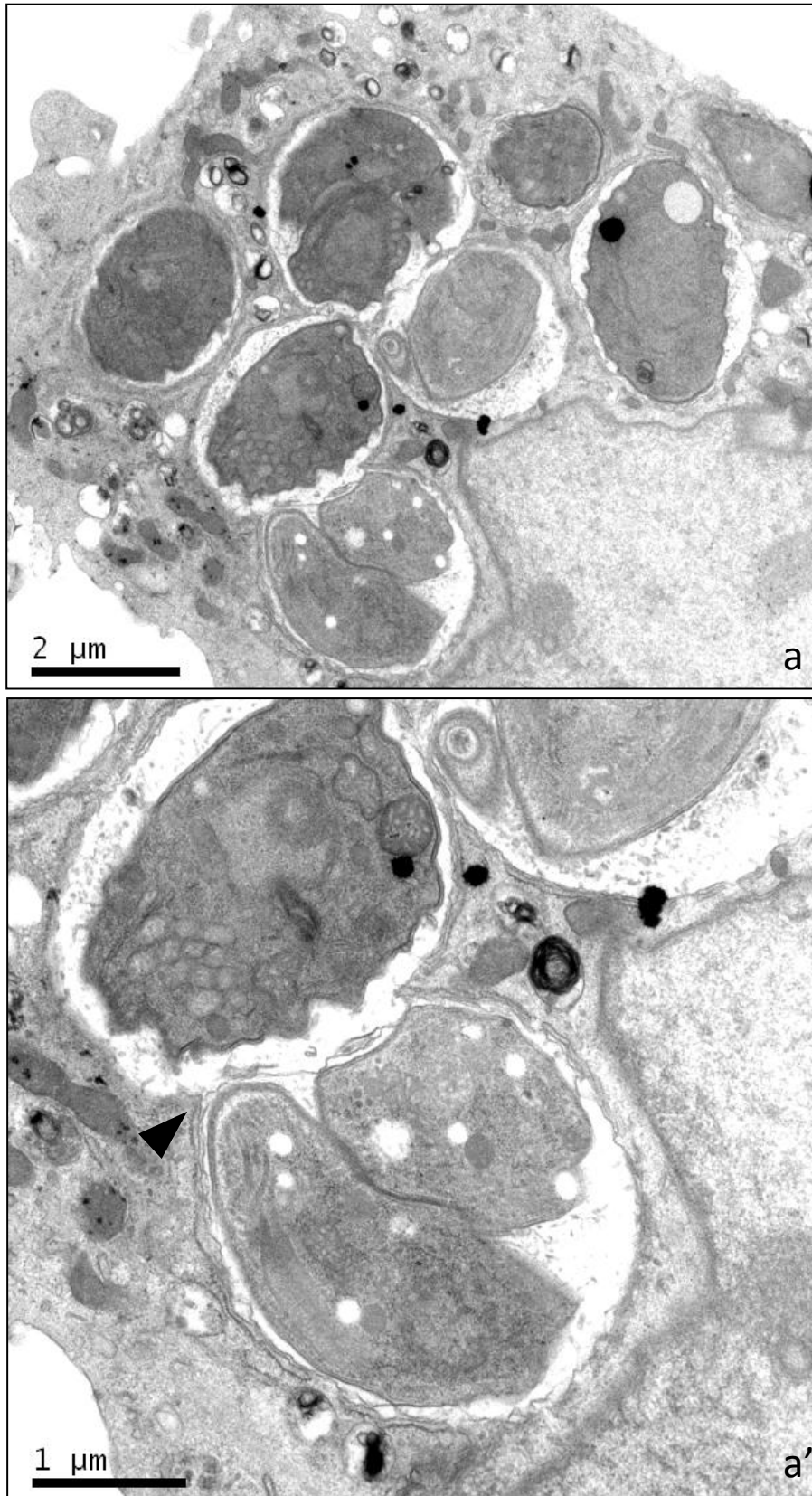


Figura 4.2.23a-a': Comunicação entre VP observada por MET em CME, após 144 h de infecção. Diferentes cortes de diferentes células que apresentam VP com diferentes formas infectivas em comunicação (cabeças de seta) (a-a').

Imagens sugestivas de formação de cistos foram observadas, após sete dias de infecção, que se caracterizavam pela presença de bradizoítos típicos (grânulos de amilopectina, róptrias eletrondensas, posição do núcleo, além do material eletrondenso no espaço vacuolar, semelhante ao constituinte da matriz cística (Fig. 4.2.26; 4.2.27 a; 4.2.28a, a'). Outro dado que reforça essa sugestão foi a presença de áreas contendo invaginações nessa membrana, o que remete à estrutura da parede cística, constituída de invaginações e vesículas (Fig. 4.2.27a, a'; 4.2.28a, a'). Nessas condições, foi detectada a associação de mitocôndrias e RE da CME a essas estruturas, que correspondem ao desenvolvimento da formação de cisto. (Fig. 4.2.26, 4.2.27a, a'; 4.2.28a, a'). O RER pôde ser observado em associação com a MVP, invariavelmente, por meio da sua face lisa (Fig. 4.2.26, 4.2.27; 4.2.28). Essa associação do RER não foi contínua, demonstrando claramente que vários perfis de RER circundam a parede cística em formação (Fig. 4.2.28a, a') e que as mitocôndrias interagem diretamente à MVP justo nas regiões ausentes de RER (Fig. 4.2.28b) e indiretamente sendo intermediada pelo RER (Fig. 4.2.26; 4.2.27; 4.2.28).

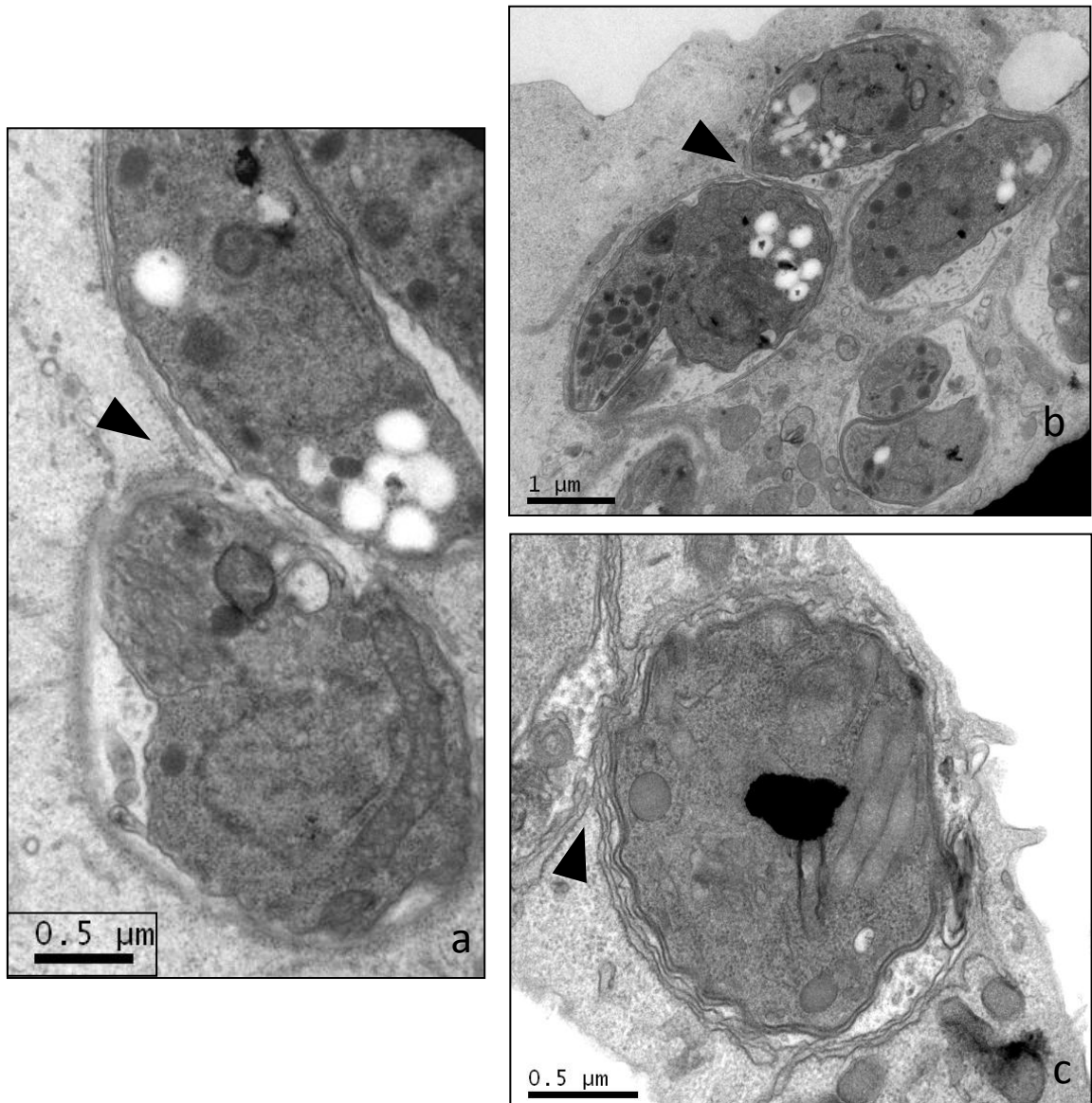


Figura 4.2.24a-c: Comunicação entre VP observada por MET em CME, após 144 h de infecção. Diferentes cortes de diferentes células que apresentam VP com diferentes formas infectivas (Bradizoítos-B e em transição-TR) em comunicação (cabeças de seta) (a-c).

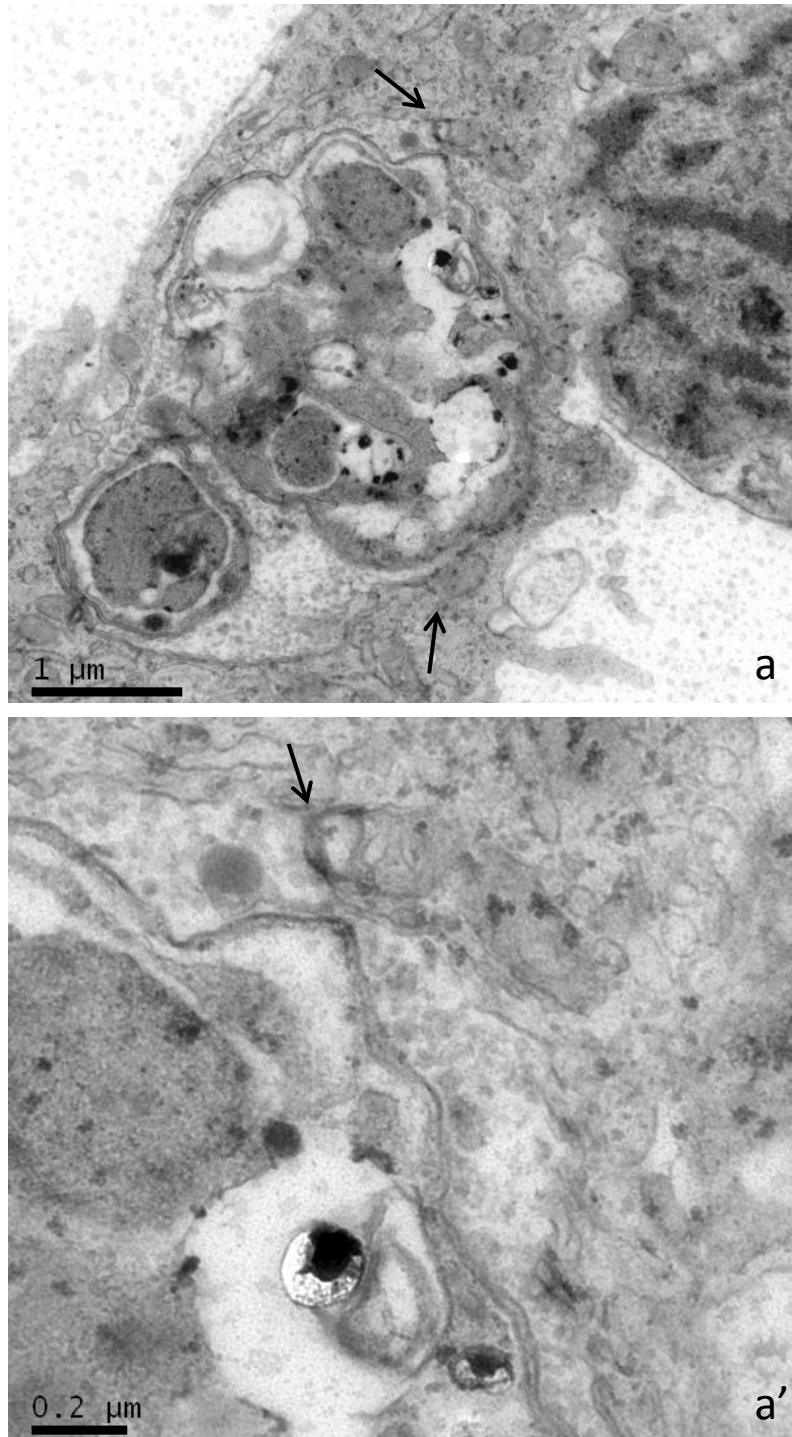


Figura 4.2.25a-a': VP contendo parasitos mortos e mantendo a associação com RE e mitocôndria de CME, após 7 dias de infecção. Célula muscular esquelética (CME) apresentando VP com bradizoítos inviáveis, porém mantendo associações diretas (setas finas) com mitocôndria e com RE (a); aumento que detalha a associação direta entre mitocôndria e a MVP (b).

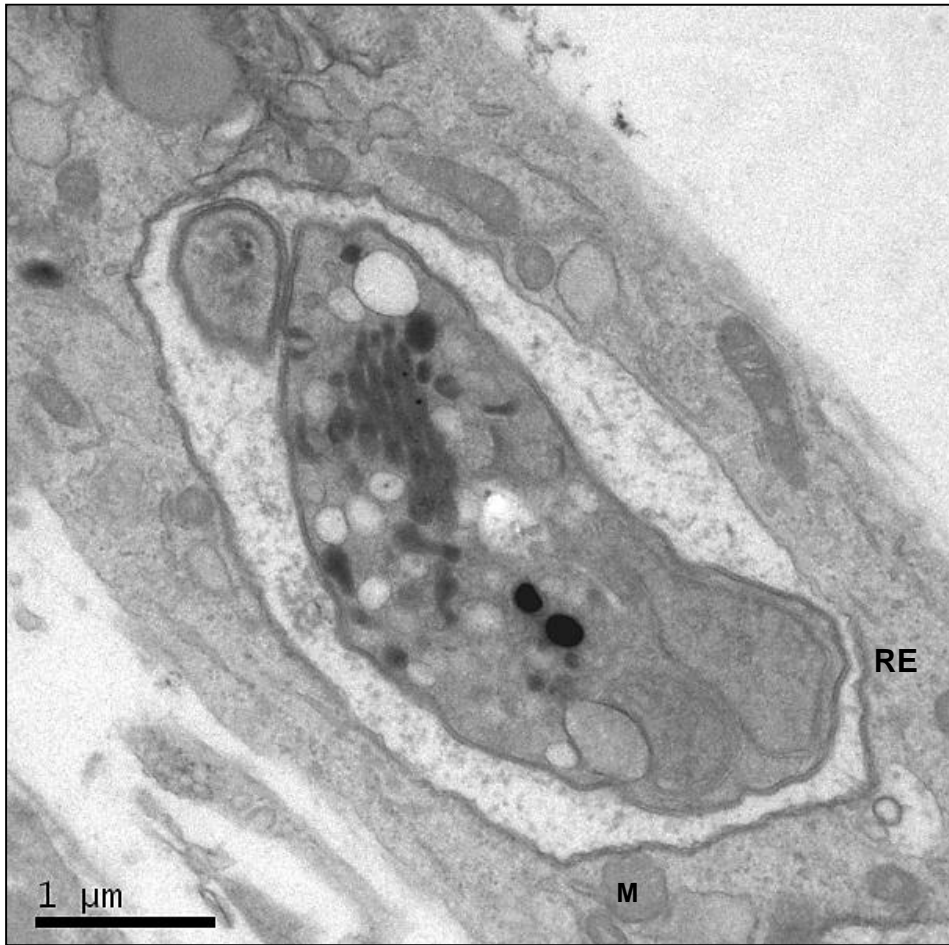


Figura 4.2.26: VP em modificação para cisto e em associação com RE e mitocôndria de CME observado por MET, após 144 h de infecção. VP apresentando material eletrondenso no espaço vacuolar, contendo bradizoíto típico (B) e em associação com RE e mitocôndria (M) (setas largas).

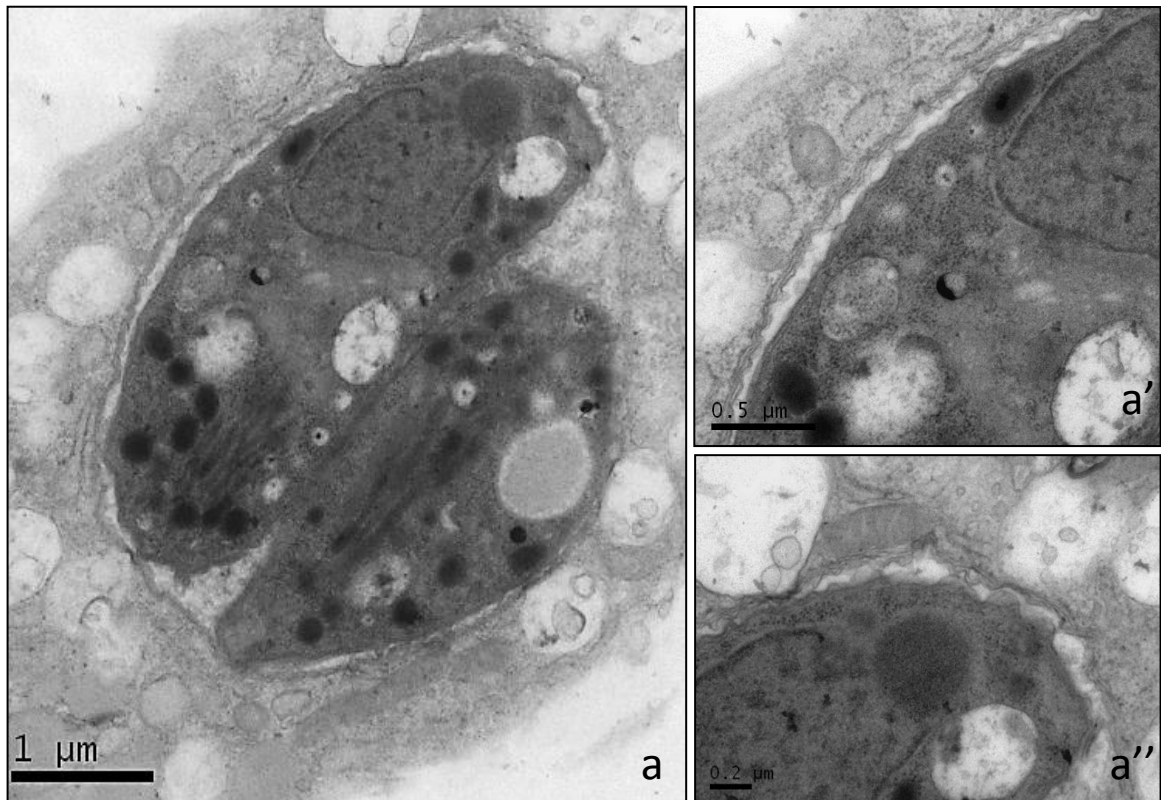


Figura 4.2.27a-a'': VP com dois bradizoítos em modificação para cisto e em associação com RE e mitocôndria de CME observado por MET, após 144 h de infecção. VP apresentando material eletrondenso no espaço vacuolar, com invaginações na MVP, contendo bradizoítos típicos e em associação com RE e mitocôndria (setas largas) (a); aumento detalhando a interação mitocôndria-RE-MVP (a'); detalhe de outra interação Mitocôndria-RE-MVP no mesmo VP (a'').

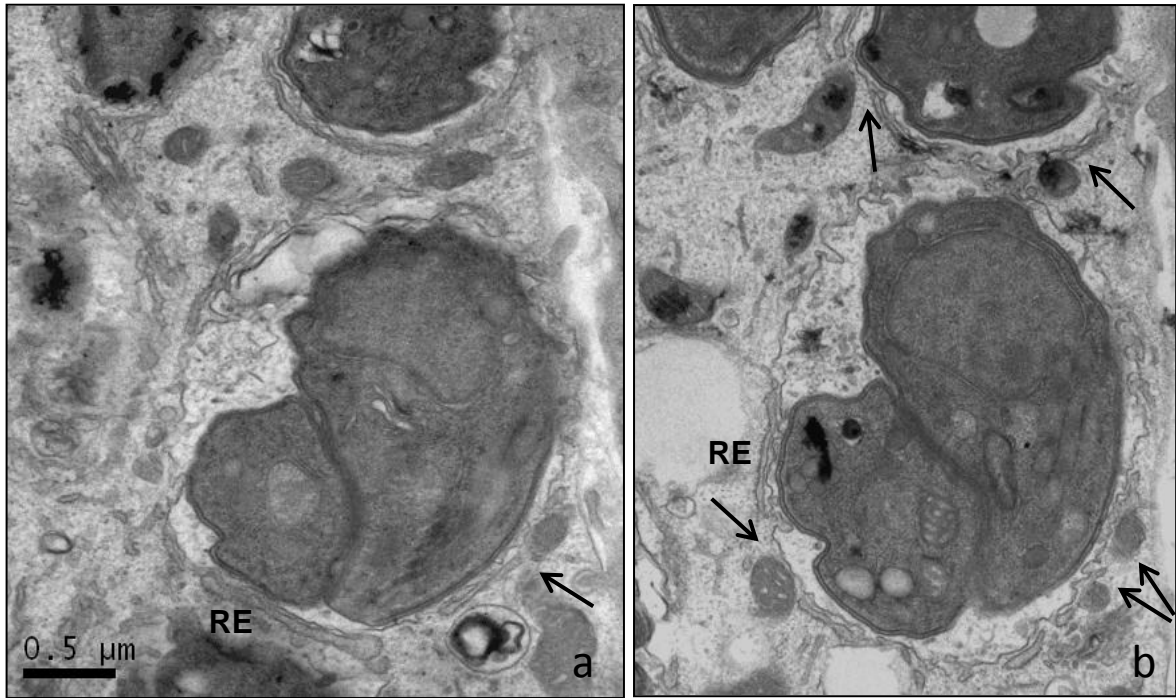


Figura 4.2.28a-b: Cortes seriados de MET de um VP com bradizoíto (B) em modificação para cisto e em associação com RE e mitocôndria de CME, após 144 h de infecção. VP apresentando invaginações na MVP e em associação com RE e associações diretas (setas finas) e indiretas (seta larga) com mitocôndrias (a-b).

4.3. Análise da taxa respiratória basal e do acoplamento das mitocôndrias da célula muscular esquelética durante a cistogênese de *T. gondii*

A respirometria de alta-resolução mostrou que o fluxo respiratório basal (taxa respiratória das células íntegras – sem prévia permeabilização) da linhagem de célula muscular esquelética (C2C12) contendo cistos teciduais (96 e 144 h de interação) não foi significativamente alterado em relação às células não infectadas (Fig. 4.3.1).

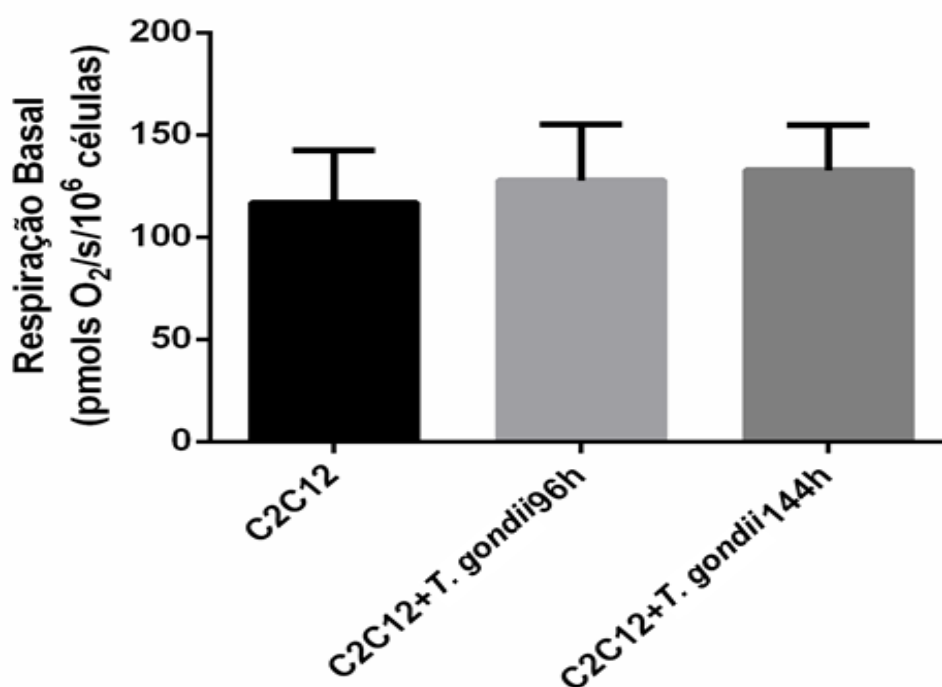


Figura 4.3.1: Taxa respiratória basal de células musculares esqueléticas durante a cistogênese do *T. gondii*. Consumo de oxigênio da linhagem de célula muscular esquelética (C2C12) não infectada; da C2C12 com 96 h de interação com *T. gondii*; da C2C12 com 144 h de interação com *T. gondii*. Nota-se que o processo de cistogênese não alterou a taxa respiratória basal de CME. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre as condições experimentais, segundo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de HolmSidak.

Além disso, a Razão do Controle Respiratório (RCR), calculada a partir da razão Estado 3/Estado 4, demonstrou que a respiração acoplada à síntese de ATP da linhagem de célula muscular esquelética (C2C12) contendo cistos teciduais prematuros e maduros (96 e 144 h de interação, respectivamente) não foi significativamente alterada, em comparação com as células não infectadas (Fig. 4.3.2).

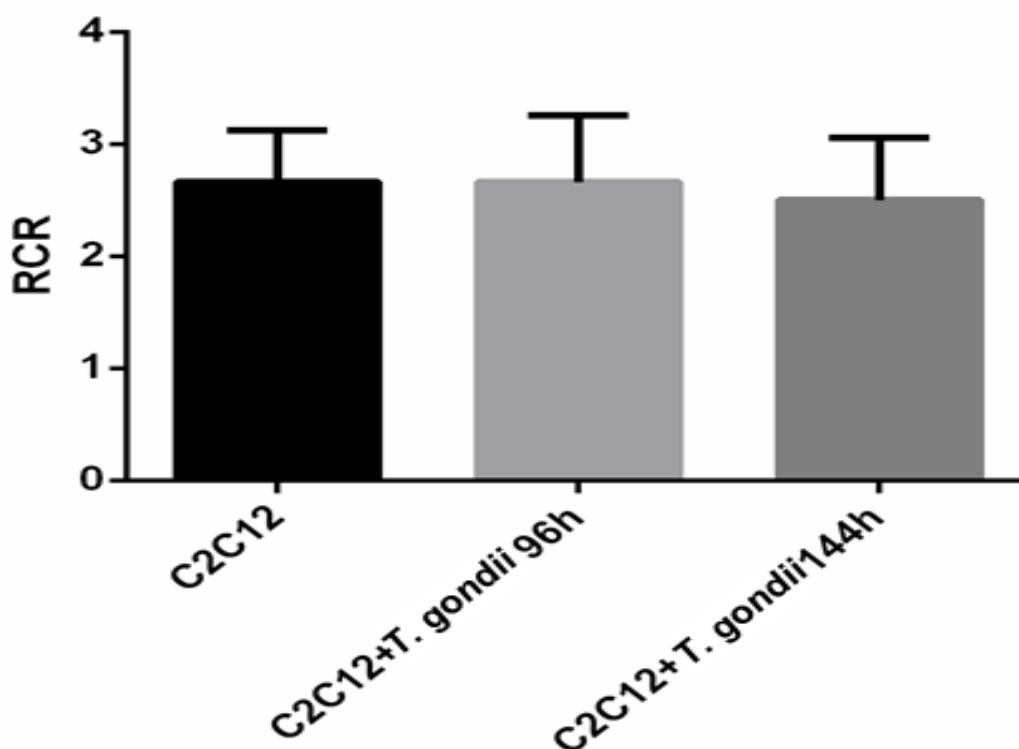


Figura 4.3.2: Razão do controle respiratório (RCR) de células musculares esqueléticas durante a cistogênese do *T. gondii*. Acoplamento mitocondrial da linhagem de célula muscular esquelética (C2C12) não infectada (barra preta); da C2C12 com 96 h de interação com *T. gondii* (barra cinza claro); da C2C12 com 144 h de interação com *T. gondii* (barra cinza escuro). Nota-se que o processo de cistogênese não alterou o acoplamento mitocondrial de CME. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre as condições experimentais, segundo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de HolmSidak.

O monitoramento das culturas por microscopia de contraste de fase garantiu que a análise por respirometria de alta resolução ocorreu durante processo de cistogênese (Fig. 4.3.3).

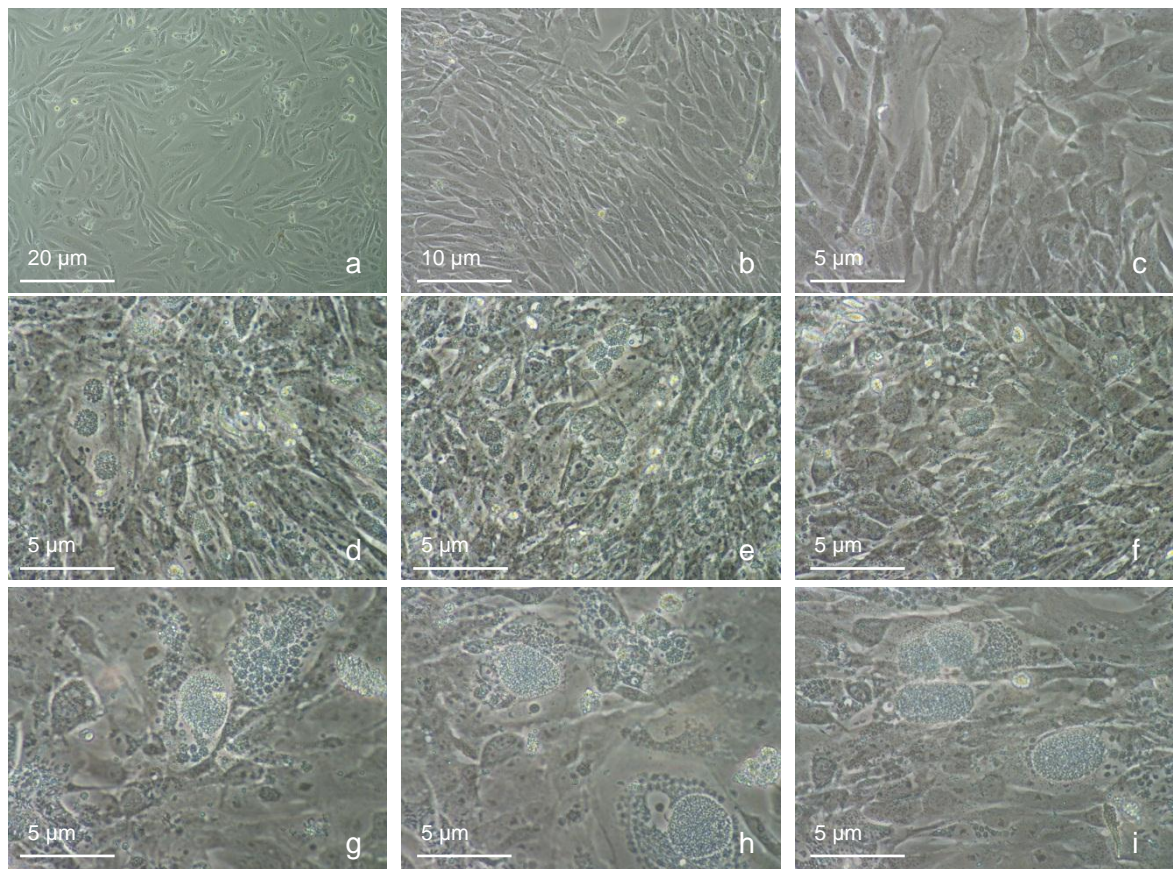


Figura 4.3.3: Monitoramento da cistogênese por microscopia de contraste de fase. Culturas de linhagem de célula muscular esquelética (C_2C_{12}) infectadas com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* apresentando múltiplos vacúolos parasitóforos e estruturas “cyst-like”, contendo número variável de parasitos. Essas imagens mostram a cistogênese *in vitro*. Culturas não infectadas (a-c) com 96 h de interação (d-f); com 144 h de interação (g-i).

4.4. Efeito do composto ISA-34 sobre a cistogênese de *T. gondii*

Os dados de quantificação de cistos teciduais (DBA-positivos) a partir de culturas tratadas com o composto ISA-34, demonstraram que tal composto causa alterações no processo de cistogênese. O efeito do composto pôde ser observado tanto nas etapas iniciais de desenvolvimento dos cistos (Fig. 4.4.1), quanto nas etapas mais tardias, quando estes cistos já estavam formados (Fig. 4.4.2). O número de cistos foi determinado por contagem fotográfica no microscópio de fluorescência que considerou a quantidade dessas estruturas em grupos de quatrocentas células musculares (contadas por meio do marcador DAPI).

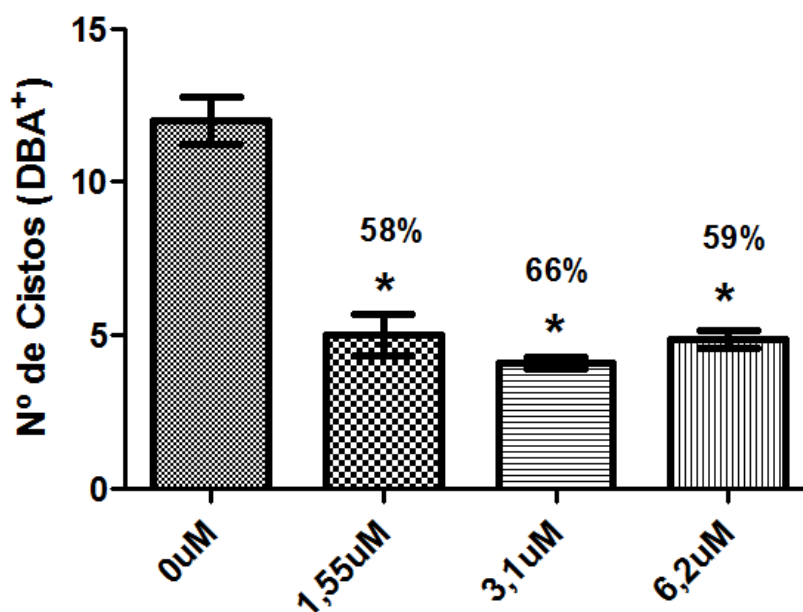


Figura 4.4.1: Efeito do composto ISA-34 sobre as etapas iniciais da cistogênese do *T. gondii*, após 48-96 h de infecção. Quantificação de cistos por microscopia de fluorescência, utilizando DBA-FITIC, para avaliar o efeito do composto ISA-34 sobre o processo de formação de cistos teciduais. Células tratadas por um período de 48 h, a partir de 48 h de infecção. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes (cada um em triplicata). A análise estatística resultou em * $p < 0,05$ em relação ao controle (0 μ M), pelo teste One-way ANOVA (Tukey)

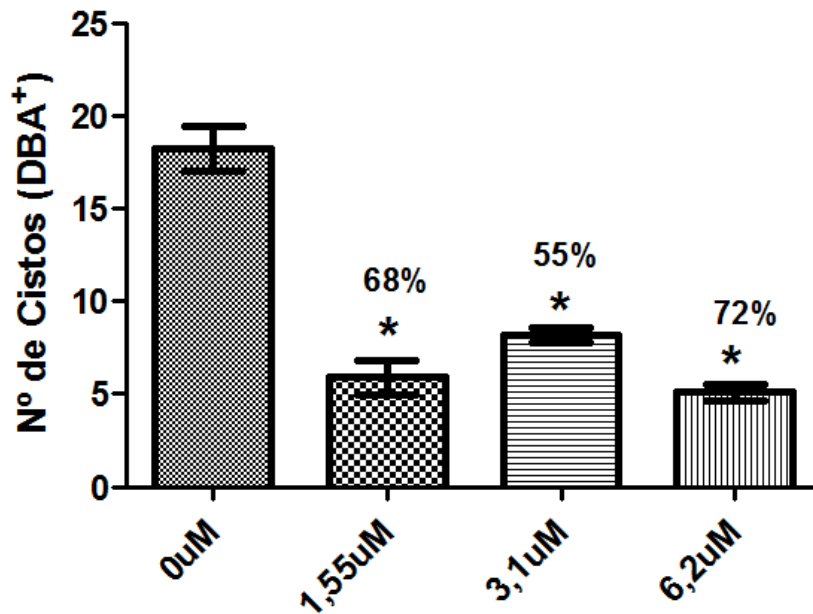


Figura 4.4.2: Efeito do composto ISA-34 sobre as etapas tardias da cistogênese do *T. gondii*, após 96-144 h de infecção. Quantificação de cistos por microscopia de fluorescência, utilizando DBA-FITIC, para avaliar o efeito do composto ISA-34 sobre a manutenção da viabilidade de cistos teciduais. Células tratadas por um período de 48 h, a partir de 96 h de infecção. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes (cada um em triplicata). A análise estatística resultou em * $p < 0,05$ em relação ao controle (0 μ M), pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

O uso do marcador fluorescente DAPI revelou que a viabilidade das células de mamífero (C_2C_{12}) frente à exposição ao composto ISA-34 pôde ser a princípio, constatada por meio da visualização da integridade do material genético no núcleo destas células (Tandon e cols., 2011; Park e cols., 2012; Padron e cols., 2013; Sobrevals e cols., 2014).

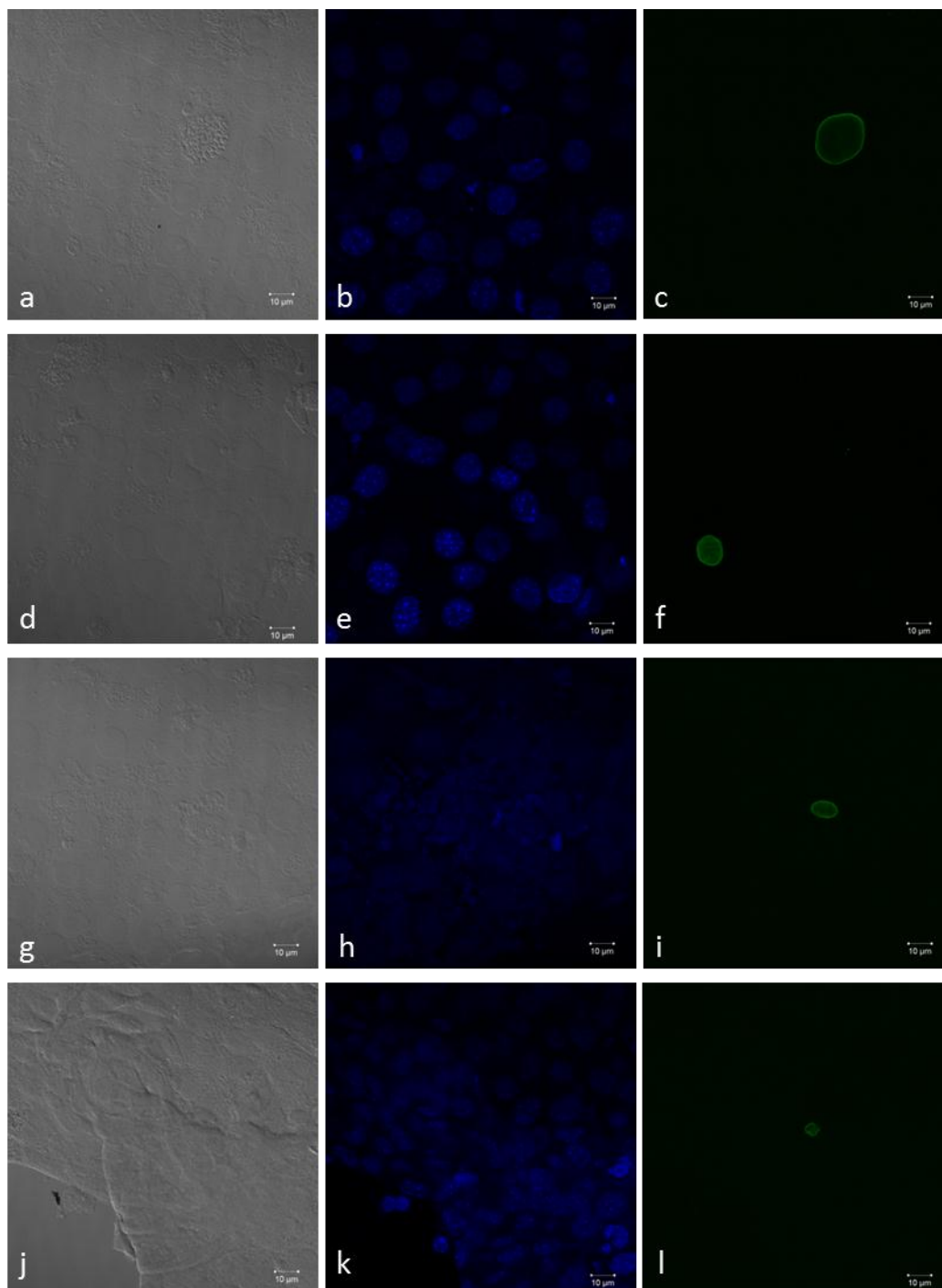


Figura 4.4.3a-l: Viabilidade da linhagem de célula muscular esquelética e de cistos maduros de *T. gondii* após exposição ao composto ISA-34. Células infectadas com taquizoítos da cepa ME49 não tratadas (a-c); tratadas com 1,55 μM do composto (d-f); tratadas com 3,1 μM do composto (g-i); tratadas com 6,2 μM do composto (j-l). As culturas foram incubadas com o composto por 48 h, a partir de 48 h até 96 h de interação célula-*T. gondii* mantém sua viabilidade.

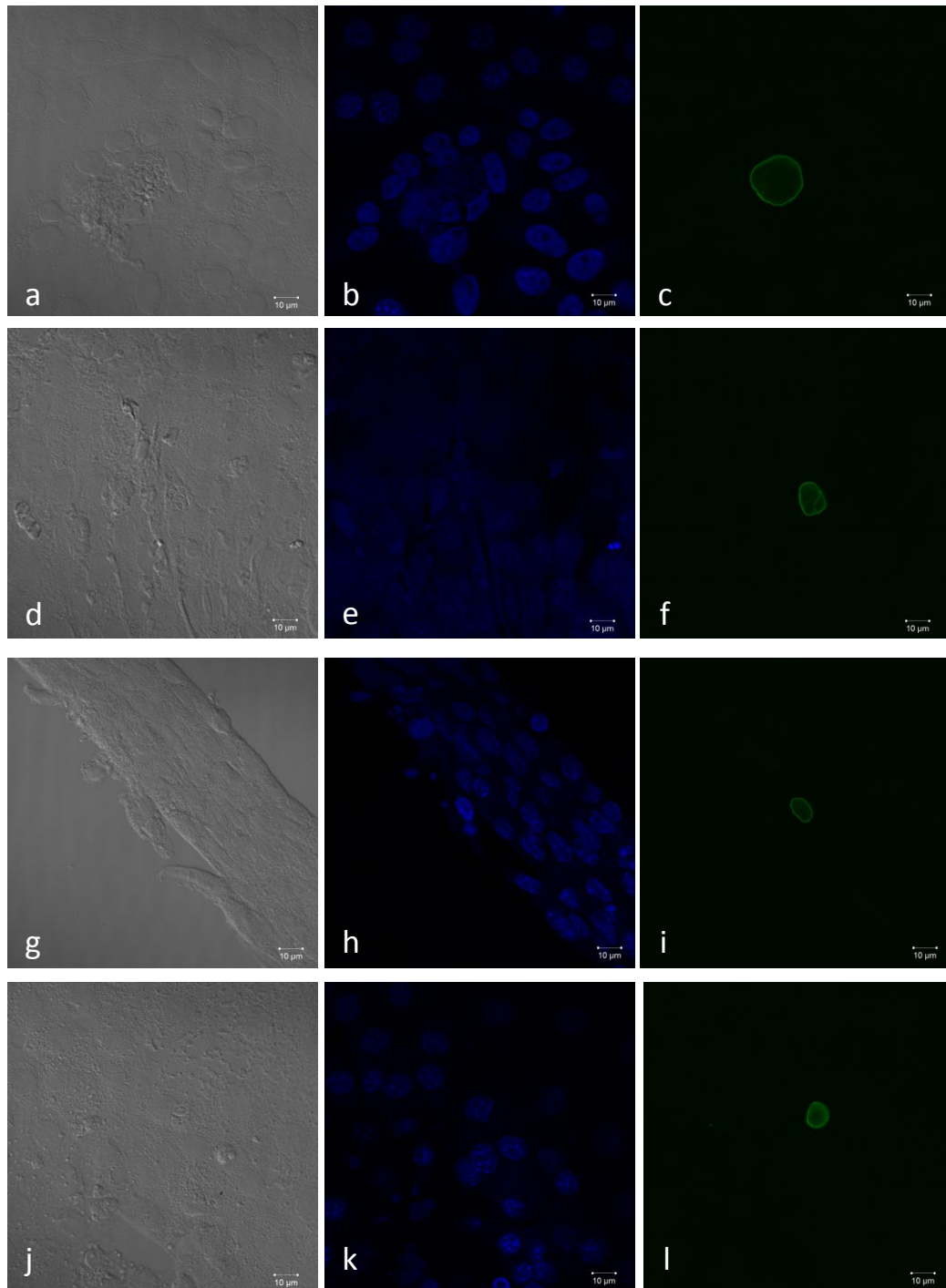


Figura 4.4.4a-l: Viabilidade da linhagem de célula muscular esquelética e de cistos maduros de *T. gondii* após exposição ao composto ISA-34. Células infectadas com taquizoítos da cepa ME49 não tratadas (a-c); tratadas com 1,55 µM do composto (d-f); tratadas com 3,1 µM do composto (g-i); tratadas com 6,2 µM do composto (j-l). As culturas foram incubadas com o composto por 48 h, a partir de 96 h até 144 h de interação célula-*T. gondii* mantém sua viabilidade.

5. DISCUSSÃO

O conjunto de dados acumulados na presente dissertação demonstra uma íntima interação da mitocôndria e do retículo endoplasmático (rugoso e liso) com o vacúolo albergando bradizoítos de *T. gondii* em células musculares esqueléticas, sugerindo uma relação direta com a provisão de fatores necessários à multiplicação do parasito (Jones e cols., 1972; Sinai e cols., 1997; Gomes e cols., 2014); (ii) a manutenção dos parasitos, com especial atenção para a cistogênese, que pode perdurar por décadas (Hill e Dubey, 2002).

O ineditismo deste trabalho se concentra em estratégias como a escolha de células musculares esqueléticas, como modelo de estudo da toxoplasmose experimental, permitindo a observação da associação do REL e mitocôndrias com o VP de bradizoítos e a susceptibilidade de cistos a um inibidor específico da fosforilação oxidativa.

O primeiro objetivo deste trabalho foi verificar se células musculares esqueléticas infectadas com bradizoítos no período de 72-144 h mantinham suas mitocôndrias ativas. O desenho experimental para responder a essa pergunta foi utilizar um marcador fluorescente que, além de indicar a funcionalidade da mitocôndria, permitia a sua visualização. Esta estratégia adicionou um novo componente a essa avaliação, mostrando de maneira indubitável que havia um recrutamento de mitocôndrias para o entorno do cisto (marcado com DBA, revelando a parede cística) durante todo o período de análise (72-144 h) (Fig. 4.1.4). Conforme avança o tempo de interação, há um sensível aumento no tamanho dos cistos, que está diretamente relacionado com o estágio de seu desenvolvimento. Cistos teciduais mais maduros são tendencialmente maiores. Os dados apresentados aqui reforçam a hipótese levantada inicialmente por Sinai e Joiner (1997, 2001 e 2002) de que o *T. gondii* utilizaria a energética da célula hospedeira para sustentar, tanto a construção, quanto a manutenção perene da fase crônica da toxoplasmose, indicando um potencial alvo para drogas, tendo por objetivo à ablação dos parasitos.

A migração de mitocôndrias para o vacúolo parasitóforo durante a infecção de *T. gondii* tem sido descrita em vários modelos celulares utilizando como infecção primária taquizoítos de cepas do tipo I, de alta virulência e não cistogênicas (Jones e Hirsch, 1972; Sinai e cols., 1997; Sinai e Joiner, 2001; Andrade e cols., 2001; Magno e cols., 2005b). Esta associação de mitocôndrias com a MVP tem sido explorada em nível molecular, responsabilizando as ROP2a, ROP2b e ROP8 (proteínas secretadas pelas róprias, que constitui uma família de cerca de 18 proteínas, com distintas funções na infecção) que, inseridas pelo parasito na MVP, atuam como mediadoras desta associação (Beckers e cols., 1997; Sinai e Joiner, 2001; Nakaar e cols., 2003; El Hajj e cols., 2006, 2007; Labesse e cols., 2009; Reese e Boothroyd, 2009). Estudos mais recentes indicam que mesmo após a depleção dos genes para estas proteínas, particularmente em taquizoítos da cepa RH, a associação mitocôndria e MVP se mantém (Pernas e Boothroyd, 2010), o que contraria frontalmente dados publicados anteriormente pelo grupo do Nakaar. Contudo, Pernas e Boothroyd (2010) avaliam que os resultados do grupo anterior poderiam estar relacionados com uma depleção *off-target* de outros membros da grande família de proteínas da ROP2, uma vez que esta compreende uma lista de mais de 12 genes similares, descritos até o ano de 2010.

A associação de organelas da célula hospedeira com a MVP durante a interação do *T. gondii* com diferentes tipos celulares foi previamente descrita, a partir dos trabalhos pioneiros de Jones & Hirsch (1972). Nosso modelo celular, que dispõe de grande quantidade de mitocôndrias, se mostrou adequado para avaliar essa associação. As primeiras análises por MET em um estudo comparativo de células não infectadas e infectadas mostrou claramente o processo dinâmico que é deflagrado logo após a invasão de CME por bradizoítos, quando mitocôndrias perdem a organização paralela ao eixo longitudinal da célula (Fig. 4.2.1a-d) e adquirem a conformação radial, circundando o VP. Esse aspecto muito bem demonstrado em algumas imagens por MET (Fig. 4.2.3a, b) enfraquece a sugestão de alguns autores, de que a localização de mitocôndrias nas proximidades do VP seria acidental, como uma consequência da falta de espaço durante o desenvolvimento do parasito na célula hospedeira (Magno e cols., 2005b). Considerando-se que a célula

muscular tem uma área citoplasmática bastante grande e que essa migração tem sido flagrada em células contendo um único vacúolo, a reorganização espacial, não poderia ser uma casualidade e muito provavelmente deve envolver vias de sinalização do parasito para esta atração. Nós consideramos que as imagens indicando essa movimentação direcionada das mitocôndrias durante a infecção com bradizoítos são bastante contundentes e devem representar uma resposta celular à invasão do *T. gondii*. Este tópico já tem sido bem explorado com taquizoítos (Jones e Hirsch, 1972; Sinai e cols., 1997; Sinai e Joiner, 2001; Magno e cols., 2005b; Gomes e cols., 2014) mas, ainda permanece um assunto controverso.

Nossas análises ultraestruturais sistemáticas da associação de organelas de CME com bradizoítos traz à tona detalhes desse evento demonstrando que não seriam restritos aos taquizoítos. As imagens são inéditas e denotam o fato de que as mitocôndrias da célula hospedeira, uma vez infectada por bradizoítos da cepa ME49, sofrem alteração na sua distribuição para um padrão radial em torno do cisto e que sua atividade permanece funcional durante esta interação. A proposta de que, em taquizoítos, esse seria um evento acidental, não corresponde aos estudos de identificação da função de algumas proteínas das róprias. Esses estudos postulam que a ROP2 é uma proteína transmembrana que está ancorada à MVP e funciona como uma molécula de aderência de mitocôndrias que, por sua vez, reconhece e inicia a importação da ROP2. Esse processo, porém, não se completa devido ao firme ancoramento da proteína à MVP (Sinai e Joiner, 2001; Nakaar e cols., 2003; Sinai, 2008). Contudo, esses trabalhos não comprovam o modelo acima e, além disso, estudos recentes da estrutura da ROP2 (Labesse e cols., 2009), sua topologia na MVP (El Hajj e cols., 2007), a função do seu domínio N- terminal (Reese e Boothroyd, 2009) e o fato de que ela é parte de uma extensa e conservada família de proteínas (El Hajj e cols., 2006), têm colocado o modelo em cheque. Para testar em definitivo se ROP2 tem papel crucial na associação mitocôndrias-MVP foram criadas linhagens deficientes em ROP2a, b e ROP8. Os resultados sugeriram fortemente que nenhuma dessas três proteínas estaria envolvida na associação mitocôndrias-MVP (Pernas e Boothroyd, 2010). Independente dessa discussão a respeito da(s) molécula(s) responsável(eis) pela associação

entre mitocôndrias da célula hospedeira e o VP, nossos dados obtidos com bradizoítos não só comprovam a associação como, também, reforçam a ideia de que esse evento não seria ocasional.

A distribuição radial das mitocôndrias culmina com a sua associação com a MVP (Fig. 4.2.4 b') e os detalhes desta interação deverão ser discutidos a seguir. Uma análise dos cortes ultrafinos aponta que os vacúolos parasitóforos, que contém bradizoítos, são circundados por mitocôndrias e perfis de RER e REL. Nossas imagens de MET remetem a mecanismos distintos de associação das mitocôndrias com o VP: via adesão direta com a MVP, sem que se observe uma região da mitocôndria preferencial para que esta se estabeleça e, indireta, mediada por RER ou REL. Essas observações têm apoio de grupos de pesquisa que avaliaram essa interação principalmente com macrófagos. Jones e cols. (1972) e Sinai e Joiner (1997), a partir de imagens de alta qualidade de cortes ultrafinos, demonstraram que essa associação sempre se estabelecia de forma direta mitocôndrias-MVP. Embora a presença de RER circundando os vacúolos fosse comum nessas micrografias, os referidos autores não descrevem esse tipo de associação. Estudos mais recentes, desenvolvidos por Magno e cols. (2005) a despeito desses dados acumulados na literatura, por meio de análises de reconstrução 3D e quantitativa, não consideram que esta seja a principal via de associação mitocôndrias-VP e que a associação predominante seria mitocôndrias-RER-MVP. Nossos resultados empregando as CME e bradizoítos não corroboram esses dados e tendem a concordar com os artigos de Jones e de Sinai e Joiner, muito embora, a associação aqui descrita inclua os dois tipos: (i) mitocôndrias com associação direta com a MVP, localizando-se muitas vezes, entre as cisternas do RER (Fig. 4.2.4 a-c; 4.2.7a-c), considerando-se que vários perfis de RER circundam os vacúolos; (ii) associação indireta, mediada por RER ou REL (Fig. 4.2.5c, d; 4.2.8b, b').

Nossas análises ultraestruturais nos chamaram a atenção para a recorrente orientação do RER com a face lisa associada à MVP e a face rugosa voltada para o citoplasma da CME. Na busca de entender essa orientação específica do RER, nos fundamentamos em estudos de outros grupos que avaliam a importância da associação do RER com o VP de *T. gondii* e do papel dessa organela como responsável pelo tráfego de

substâncias entre o parasito e a célula hospedeira (Magno e cols., 2005; Goldszmid e cols., 2009; Gomes e cols., 2014). Goldszmid e colaboradores (2009) publicaram dados que mostram que a associação do RE de células dendríticas com o VP de *T. gondii* caracteriza uma nova via de apresentação cruzada de antígenos. Este fato ajudaria explicar a capacidade de hospedeiros imunocompetentes de conter a infecção pelo *T. gondii*. Diante desses dados, nós propomos que o RER se associa com o VP sempre sob esta orientação, pois a face lisa é reconhecidamente responsável pela síntese de vesículas exocíticas e de transporte intracelular. Então, propomos que é por meio desta via que o parasito obtém e envia informações e substâncias para outros vacúolos, organelas da célula hospedeira e para o meio extracelular. Em função disso, essa associação ativamente orquestrada pelo parasito explicaria muito do crescimento da MVP e do parasito durante sua proliferação e desenvolvimento intracelular, como proposto também pelo grupo de De Souza (De Melo e cols., 1992; De Melo e de Souza, 1997). Recentemente, essa proposta foi corroborada, durante a interação de taquizoítos e músculo esquelético pelo nosso grupo, mostrando que corpúsculos lipídicos são incorporados à MVP, espaço vacuolar e à membrana do parasito intravacuolar. Esse conjunto de dados reforça a ideia do recrutamento de organelas da célula hospedeira, como uma importante fonte de lipídios e de outros fatores, para a manutenção e desenvolvimento do parasito, quer durante o ciclo lítico (Gomes e cols., 2014) quer durante a cistogênese (resultados apresentados nesta dissertação). Ademais, nossas imagens de MET contemplam também uma intensa vesiculação nas regiões de interação entre mitocôndrias-MVP e RER-MVP (Fig. 4.2.18a, b; 4.2.19a, b), o que também revalida essa hipótese.

Estudos recentes mostram que, durante o egresso de taquizoítos da cepa RH, existem alguns fatores que disparam os mecanismos de sinalização para o rompimento das membranas (vacuolar e plasmática), e a maneira como essa ruptura ocorre, para permitir a evasão do parasito da célula hospedeira. Um desses fatores mais bem caracterizados é o cálcio, que a depender da sua concentração intracelular no parasito e na célula hospedeira, modula os mecanismos que promovem o egresso dos taquizoítos durante seu ciclo lítico (revisto em Blackman e Carruthers, 2013). Na associação de organelas à MVP,

se destaca no nosso modelo de CME, uma organela adicional, responsável pela homeostase do cálcio intracelular, com importante papel na contração muscular, o REL. No caso do músculo, esse retículo é denominado retículo sarcoplasmático, dada a sua tradicional localização sob a membrana da célula muscular, denominada sarcolema (Ezerman e Ishikawa, 1967; Schiaffino e Margreth, 1969; Jorgensen e cols., 1977). Os ensaios aqui desenvolvidos com bradizoítos em CME mostram um recrutamento e íntima associação de REL diretamente com a MVP, à semelhança do que ocorre com o RER. Com base em vários estudos que relacionam a sinalização de cálcio entre RE e mitocôndria, nós acreditamos que essa associação do retículo sarcoplasmático, cuja função é de armazenamento de cálcio para suas funções fisiológicas, com a MVP, seria uma estratégia de sobrevivência do *T. gondii*. Essa proposta é sustentada pela patente participação do cálcio no disparo da via intrínseca de apoptose, a qual passa pela liberação de citocromo c mitocondrial (Hajnóczky e cols., 2003, 2006; Breckenridge e cols., 2003; Spät e cols., 2008; revisto em Santo-Domingo e Demarex, 2010; Parys, 2014). Além disso, outra sustentação vem do próprio desenvolvimento de bradizoítos ao longo do curso da cistogênese, uma vez que neste contexto, o *T. gondii* tem interesse em manter a célula hospedeira viável por longos períodos, a partir da modulação negativa da apoptose (Laliberté e Carruthers, 2008).

Apesar do nosso principal foco no presente trabalho ter sido a interação com bradizoítos da cepa cistogênica ME-49 e as decorrentes associações com as organelas de CME foram observadas também, essas associações com taquizoítos da mesma cepa. Nossos dados corroboram o conhecimento acumulado a partir do estudo dessas associações envolvendo taquizoítos da cepa RH (Jones e Hirsch, 1972; Sinai e cols., 1997, Sinai e Joiner, 2001; Magno e cols., 2005; Gomes e cols., 2014).

Agregando novos dados à interação *T. gondii*-célula hospedeira, nos chamou a atenção uma imagem do artigo de Magno e cols. (2005b) em que dois vacúolos estão justapostos intermediados pelo RER, sem que os autores descrevessem fusão desses perfis. As imagens de CME infectadas por cerca de 5 dias com bradizoítos, obtidas por MET, apontam na direção inversa. Células contendo múltiplos vacúolos, com um a dois parasitos

(bradizoítos/taquizoítos), apresentam estreito contato entre suas membranas, com e sem mediação pelo RER, com imagens sugestivas de fusão ou perda da integridade dessas membranas. Obviamente que cortes seriados e reconstrução 3D seriam metodologias mais apropriadas para esclarecer se está ocorrendo realmente comunicação entre vacúolos, mediada ou não pelo RER. Nós não podemos interpretar ainda o significado biológico destes eventos, abrindo então uma nova linha de investigação.

CME infectadas com bradizoítos e analisadas após 9 dias de infecção mostraram vacúolos parasitóforos contendo parasitos em avançado estado de degradação, mantendo a associação de mitocôndria e RER. Esses achados não foram descritos por Jones e Hirsch (1972), Joiner e cols. (1990) e Morisaki e cols. (1995), quando ofereceram parasitos mortos por fixação ou opsonizados. Por outro lado, quando Sinai e cols. (1997) trataram culturas infectadas com doses microbicidas de pirimetamina, provocaram a morte dos parasitos que haviam invadido as células ativamente, ou mesmo quando usaram inibidores de potencial de membrana mitocondrial (NaN_3 e CCCP), observaram o mesmo fenômeno de manutenção da associação MVP-organelas. Considerando-se que a entrada de parasitos por fagocitose não envolve a secreção de róprias e inserção de suas proteínas na MVP, estamos inclinados a concordar com as sugestões de Sinai e cols. (1997) de que uma vez que o parasito invada a célula por penetração ativa, não é necessário um *turnover* dos “receptores” do parasito para sustentar estas associações de organelas à MVP.

Agregado ao desenvolvimento de bradizoítos em CME, além da associação de mitocôndrias, RER e REL à MVP, observou-se que durante o período de proliferação celular ocorre um aumento considerável da rede intravacuolar (RIV), à semelhança do que tem sido descrito com taquizoítos de cepa RH (Magno e cols., 2005b). De especial no nosso trabalho, acresce a observação de que mitocôndrias são vistas aderidas às regiões de contato da RIV com a MVP. Isso não nos surpreende, tendo em vista o amplo conhecimento de que a MPV é modificada bioquimicamente por uma intensa exocitose de moléculas das róprias e dos grânulos densos (Brossier e Sibley, 2005a), e, ainda, que as proteínas GRA2, GRA3 e GRA6 possuem um papel

fundamental na formação dos nanotúbulos, sendo a GRA2 e GRA4 envolvidas na organização de vesículas, que após alongamento, darão origem à rede intravacuolar madura, e a GRA6 na estabilização desta RIV (Merciere cols., 2002; Caffaro e Boothroyd, 2011). Várias dessas proteínas modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, através da formação de poros, 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). Um estudo ultraestrutural sugere que a RIV funcionaria como um suporte mecânico para o *T. gondii* no interior do VP (Magno e cols., 2005b). Outros estudos discutem que a GRA7 tem sido relacionada com a formação dos pequenos túbulos derivados da invaginação da MVP, que estariam atuando no transporte de lipídios, através do espaço vacuolar até o parasito (Coppens e cols., 2006). Em contraponto, recentemente foi demonstrado que a deleção de GRA 7 não interrompe o fluxo de ácidos graxos do hospedeiros para a RIV (Caffaro e Boothroyd, 2011). Diante desses dados, nós sugerimos com base nas imagens de MET, que evidenciam um desenvolvimento da RIV em áreas subjacentes ao contato mitocôndrias-MVP, que essa rede teria um papel no tráfego de substâncias entre parasito e o citoplasma da célula hospedeira, como fonte de nutrientes e fatores necessários ao desenvolvimento do *T. gondii*. Essa proposta é reforçada pelo fato de estarmos trabalhando com formas bradizoítas, cujo cumprimento do seu destino intracelular (cistogênese) é dependente do estabelecimento de vias de aquisição ativa de nutrientes para sua manutenção por décadas no interior dos cistos.

O único artigo que abordou a associação de organelas com a parede cística durante a cistogênese *in vitro* foi Lindsay e colaboradores (1993) infectando fibroblastos humanos com vários isolados de *T. gondii*. Os autores fizeram estudos comparativos do desenvolvimento de cistos a partir de diferentes isolados e com diferentes tipos celulares, não obtendo êxito com a cepa RH, a partir da infecção com taquizoítos. Isso difere dos resultados do nosso grupo, mostrando a geração de bradizoítos espontaneamente em células musculares esqueléticas *in vitro* (Ferreira-da-Silva e cols., 2009). As micrografias eletrônicas de Lindsay e colaboradores (1993) mostram vacúolos

com formas taquizoítas circundados por mitocôndrias morfologicamente típicas. Por outro lado, observa-se uma estrutura achatada com uma matriz bastante eletrondensa associada tanto aos vacúolos parasitóforos quanto à parede cística. Identificar essas estruturas como mitocôndrias estaria fora dos padrões morfológicos dessas organelas, que são mais compatíveis com perfis de RE. Além disso, dada a limitação da área de observação do cisto, mostrada no referido artigo, restrito a uma única imagem e com grande ampliação do mesmo, nós não fomos capazes de observar se mitocôndrias típicas estavam associadas ou se RER de morfologia padrão estivessem também interagindo com a parede cística.

Durante o desenvolvimento da cistogênese de *T. gondii*, a partir da infecção de CME com bradizoítos, foi possível monitorar características ultraestruturais dos parasitos intravacuolares: róptrias eletrondensas, localização posterior do núcleo, grânulos de amilopectina, aspecto da matriz vacuolar com material eletrondenso à semelhança do encontrado na matriz cística, intensas invaginações da membrana do vacúolo parasitóforo, adquirindo morfologia compatível com a formação de parede cística (MVP-PC). Esses vacúolos modificados estavam circundados por perfis de RER com mitocôndrias associadas à face rugosa e a face lisa, estabelecendo a conexão com a MVP-PC e, muitas vezes, mitocôndrias eram vistas aderidas diretamente à MVP-PC, reforçando a ideia da dependência do desenvolvimento de cistos da maquinaria energética da célula hospedeira.

Estudos iniciais do metabolismo energético de taquizoítos e bradizoítos foram desenvolvidos por Denton e colaboradores (1996) que detectaram a atividade da [SDH] e da [isocitratodesidrogenase NADP⁺-dependente] em homogenatos de taquizoítos, enquanto bradizoítos não mostraram níveis detectáveis. Esses dados evidenciam a presença do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) associados com o sistema de transporte de elétrons (STE) somente em taquizoítos. Incubações de taquizoítos com inibidores mitocondriais induziram o aparecimento de marcadores específicos de bradizoítos e uma diferenciação *in vitro* (Bohne e cols., 1994; Tomavo e Boothroyd, 1995). Além disso, Vercesi e colaboradores (1998) estudaram a funcionalidade do sistema de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa

de *T. gondii* e observaram que estas vias respiratórias terminais são diferentes das do hospedeiro mamífero. Ensaio empregando taquizoítos da cepa RH e células endoteliais de veia umbilical humana avaliaram temporalmente por até 20 h, mostraram claramente que o metabolismo mitocondrial dessas células é regulado pela presença do parasito intracelular (Silva, 2013). Taquizoítos de cepas tipo I são altamente virulentos e modulam preferencialmente o ciclo lítico, levando ao egresso dos parasitos e rompimento das células. A avaliação do consumo de oxigênio e o acoplamento mitocondrial, nos tempos iniciais desta interação (2 e 6h), foram drasticamente diminuídos em cerca de quase 50% e 40%, respectivamente, demonstrando que esses taquizoítos independem do metabolismo energético da célula para sua proliferação. Esse conjunto de resultados foi crucial para perscrutarmos a participação do metabolismo mitocondrial da célula hospedeira no processo de cistogênese de *T. gondii* (Silva, 2013).

Na busca por entender o comportamento metabólico das CME durante a cistogênese, nós realizamos experimentos pilotos de respirometria de alta resolução, cujos resultados estão sendo apresentados na presente dissertação. A principal abordagem foi avaliar a taxa respiratória basal e o acoplamento mitocondrial dessas células infectadas no curso dos tempos de 96 e 144h de interação, quando cistos já eram encontrados nestas culturas. A cistogênese foi monitorada momentos antes do teste por meio da microscopia de contraste de fase, demonstrando imagens contundentes de cistos nas culturas garantindo, assim, que o evento tinha se estabelecido *in vitro* (Fig. 4.3.3). Nossa abordagem no presente trabalho teve como diferencial o emprego taquizoítos da cepa ME-49 (tipo II, cistogênica), cujo destino intracelular está direcionado para a formação e manutenção de cistos, por longos períodos. Assim, nossos dados mostram outro tipo de regulação sobre o metabolismo mitocondrial da CME, durante esta interação. O consumo de oxigênio e o acoplamento mitocondrial das culturas infectadas por 96 e 144 h se mantiveram naqueles mesmos patamares das culturas não infectadas (controle). Isso é indicativo de que durante a cistogênese, o parasito mantém constante o metabolismo mitocondrial da CME, preservando ativa a produção de energia celular para seu benefício garantindo, assim, o sucesso da infecção crônica.

Para ratificar a participação do metabolismo mitocondrial da célula hospedeira no processo de cistogênese de *T. gondii* foi introduzido neste trabalho, o composto ISA-34. Este é um composto derivado de Atovacona, com alta afinidade pelo citocromo bc1 (complexo III da cadeia respiratória) e consequente efeito inibitório sobre a fosforilação oxidativa. Estudos *in vitro* utilizando este composto contra *Plasmodium falciparum* confirmaram sua atividade antimalárica. Muito embora sua ação não tenha sido melhor do que o medicamento atualmente em uso contra malária (cloroquina) (Sharma e cols., 2013), não se descarta a possibilidade de se testar esse composto contra *T. gondii*, uma vez que ambos pertencem ao Filo Apicomplexa. Como dito previamente, Denton e colaboradores (1996) demonstraram que bradizoítos, diferentemente de taquizoítos, não possuem as vias do ciclo dos ácidos tricarboxílicos associados com o sistema de transporte de elétrons. Mais tarde, Vercesi e colaboradores (1998) relataram que as vias respiratórias terminais são diferentes entre o parasito e as do hospedeiro mamífero. Outro conhecimento que converge para o emprego deste composto na toxoplasmose experimental *in vitro* tem como base os resultados de MacFaden e colaboradores (2000) que caracterizaram mutações no domínio Q_o do citocromo b de *T. gondii*, desvendando um dos seus principais mecanismos de resistência à Atovacona. Recentemente, Doggett e colaboradores (2012) desenvolveram intervenções farmacológicas baseadas nesta resistência de *T. gondii* à Atovaquona e conseguiram reduzir, consideravelmente, o número de cistos, *in vitro* e *in vivo*. Neste contexto, os ensaios experimentais desenvolvidos neste trabalho utilizando o composto ISA-34 sobre a interação de bradizoítos e a célula muscular revelaram um potente efeito inibidor, não dependente de dose, do composto sobre a formação de cistos (até 66%) e sobre sua manutenção intracelular (até 72%). Diante desse conjunto de resultados, podemos sugerir que o processo de estabelecimento e manutenção da cistogênese de *T. gondii* em células musculares esqueléticas é consideravelmente dependente do metabolismo energético da célula hospedeira.

6. CONCLUSÕES

- (i) A plena atividade de mitocôndrias das CME e sua associação com cistos no curso da cistogênese demonstram que, neste estágio, o parasito não inativa a principal via de geração de energia da célula hospedeira;
- (ii) O estudo ultraestrutural sistemático de associações diretas entre mitocôndrias e a MVP-PC, do RER com a face lisa voltada para a MVP, algumas vezes mediando associações mitocôndrias-MVP, evidencia o recrutamento e remodelamento dessas organelas pelo parasito;
- (iii) A associação entre o REL de CME e a MVP, remete à ideia de uma possível regulação negativa da apoptose pelo parasito;
- (iv) A manutenção do consumo de O₂ e do acoplamento mitocondrial indica que a cistogênese pode estar sendo sustentada pela maquinaria energética da célula hospedeira;
- (v) O efeito inibitório do composto ISA-34 sobre a cistogênese aponta uma possível contribuição do metabolismo mitocondrial da célula hospedeira nesta estratégia evolutiva do *T. gondii*;
- (vi) Esse conjunto de dados contribui para um melhor entendimento dos principais recursos utilizados pelo *T. gondii* para estabelecer uma relação harmônica com seu hospedeiro e abre novas perspectivas para terapias alternativas contra a toxoplasmose.

7. REFERÊNCIAS

- Alexander, D.L.; Mital, J.; Ward, G.E.; Bradley, P.; Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1: e17
- Andrade, E.F.; Stumbo, A.C.; Monteiro-Leal, L.H.; Carvalho, L.; Barbosa, H.S. (2001). Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J Submicrosc Cytol Pathol.* 33: 337-341
- Barbosa, H. S.; Silva, M. F. F.; Guimaraes, E. V.; Carvalho, L.; Rodrigues, R. M. (2005). Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J Parasitol.* 91: 182-184
- Beckers, C.J.; Wakefield, T.; Joiner, K.A. (1997). The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol Biochem Parasitol.* 89: 209-223
- Blackman, M.J. e Carruthers, V.B. (2013). Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol.* 16: 1-6
- Blondel, B.; Roijen, I.; Cheneval, J.P. (1970). Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experimentia* 27: 356-358
- Bohne, W.; Heesemann, J.; Gross, U. (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun.* 62: 1761-1767
- Boothroyd, J.C.; Dubremetz, J.F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 6:79-88
- Bradley, P.J., Sibley, L.D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr Opin Microbiol.* 10: 582-587.
- Breckenridge, D.G.; Stojanovic, M.; Marcellus, R.C.; Shore, G.C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 160: 1115-1127
- Brossier, F.; Jewett, T.J.; Sibley, L.D.; Urban, S. (2005a). A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 4146-4151
- Brossier, F.; Sibley, L.D. (2005b). *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 2266-2272
- Burg, J.L.; Grover, C.M.; Pouletty, P.; Boothroyd, J.C. (1989) Direct and sensitive

- detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol.* 27: 1787-1792
- Caffaro, C.E.; Boothroyd, J.C. (2011). Evidence for host cells as the major contributor of lipids in the intravacuolar network of *Toxoplasma*-infected cells. *Eukaryot Cell.* 10: 1095-1099
- Caldas, L.A.; Attias, M.; De Souza, W. (2009). Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS Microbiol Lett.* 301: 103–108
- Carruthers, V.B. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81: 111-122
- Cesbron-Delauw, M.F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today.* 10: 293-296
- Chance, B., Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 17: 1158-1165
- Chatton, E.; Blanc, G. (1917). Notes etre flexions sur le toxoplasme and le toxoplasme du gondi. (*Toxoplasma gondii* Ch. Nicolle et Manceaux 1909). *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 10: 1-41
- Coppens, I.; Dunn, J.D.; Romano, J.D.; Pypaert, M.; Zhang, H.; Boothroyd, J.C. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 21: 261-274
- Cuomo, G.; D'Abrosca, V.; Rizzo, V.; Nardiello, S.; La Montagna, G.; Gaeta, G. e B. Valentini, G. (2013). Severe polymyositis due to *Toxoplasma gondii* in an adult immunocompetent patient: a case report and review of the literature. *Infect.* 41: 859-862
- Da Silva, F.W.S.; Alves, N.D.; Amóra, S.S.A.; Texeira, F.H.V.; Accioly, M.P.; Carvalho, C.G.; Nóbrega, R.M.; Filgueira, K.D.; Feijó, F.M.C. (2006). Toxoplasmosis: a review. *Ciência Animal.* 16: 71-77
- De Melo, E.J.T., De Souza, W. (1997). A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 83: 252-256
- De Melo, E.J.T.; Carvalho, T.U.; De Souza, W. (1992). Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* 17: 311-317
- De Souza, W. (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.* 123: 1-18.
- Denton, H.; Roberts, C.W.; Alexander, J.; Thong, K.; Coombs, G.H. (1996). Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett.* 137: 103–108

- Diniz, E.M.A., Vaz, F.A.C. (2003). Qual é a recomendação atual para o tratamento da toxoplasmose congênita? *Rev Assoc Med Bras* 49: 1-7
- Doggett, J.S.; Nilsenb, A.; Forquer, I.; Wegmann, K.W.; Jones-Brando, L.; Yolken, R.H.; Bordón, C.; Charmane, S.A.; Katnenie, K.; Schultz, T.; Burrows, J.N.; Hinrichs, D.J.; Meunierg, B.; Carruthers, V.B.; Riscoe, M.K. (2012). Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. *PNAS*. 109: 139-147
- Dos Santos, T.A.T.; Portes, J.A.; Damasceno-Sá, J.C.; Caldas, L.A.; De Souza, W.; DaMatta, R.A.; Seabra, S.H. (2011). Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *Plos One*.6: 278-187
- Dubey, J. P.; Lago, E. G.; Gennari, S. M.; Su, C.; Jones, J. L. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitol*. 139: 1375-1424
- Dubey, J.P. (1997). Bradyzoite-Induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of - different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryotic Microbiol*. 44: 592-602
- Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*.126: 1-8
- Dubey, J.P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J Parasitol* 39: 877-882
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol*.11: 267-299
- El Hajj, H.; Demey, E.; Poncet, J.; Lebrun, M.; Wu, B.; Galeotti, N.; Fourmaux, M.N.; Mercereau-Puijalon, O.; Vial, H.; Labesse, G.; Dubremetz, J.F. (2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6: 5773-5784
- El Hajj, H.; Lebrun, M.; Fourmaux, M.N.; Vial, H.; Dubremetz, J.F. (2007). Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell Microbiol*. 9: 54-64
- Ezerman, E.B., Ishikawa, H. (1967). Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and t system in developing chick skeletal muscle *in vitro*. *J Cell Biol*. 35: 405-420
- Fatica, A., Bozzoni, I. (2013). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev Gen*. 15: 7-21
- Ferguson, D.J.P. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 25-46

- Ferreira da Silva, M.F.; Rodrigues, R. M.; Andrade, E. F.; Carvalho, L.; Gross, Uwe; Lüder C.G.K.; Barbosa, H.S. (2009). Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 196-200
- Ferreira-da-Silva, M.F.; Takacs, A.C.; Barbosa, H.S.; Gross, U.; Lüder, C.G.K. (2009). Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int J Med Microbiol*. 299: 381-388
- Frenkel, J.K. (1970). Pursuing Toxoplasma. *J Infect Dis*. 122: 553-559
- Frenkel, J.K. (1973). Toxoplasma in and around us. *BioScience*. 23: 343-352
- Frenkel, J.K.; Dubey, J.P.; Miller, N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 167: 893-896
- Fu, P.P.; Xia, Q.; Hwang, H.M.; Ray, P.C.; Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Analysis*. 22: 64-75
- Goldszmid, R.S.; Coppens, I.; Lev, A.; Caspar, P.; Mellman, I.; Sher, A. (2009). Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *JEM*. 206: 399-410
- Gomes, A.F.; Magalhães, K.G.; Rodrigues, R. M.; Carvalho, L.; Molinaro, R.; Bozza, P.T.; Barbosa, H.S. (2014). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2. *Parasites & Vectors*. 7: 47-56
- Gomes, A.F.; Guimaraes, E.V.; Carvalho, L.; Correa, J.R.; Lima, L.M.; Barbosa, H.S. (2011). *Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis. *BMC Microbiol*. 11: 110-117
- Gray, M.W.; Burger, G.; Lang, B. F. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science*. 283: 1476-1481
- Guimaraes, E. V.; Carvalho, L.; Barbosa, H.S. (2009). Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 170-174
- Guimarães, E.V.; de Carvalho, L.; Barbosa, H.S. (2008). Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J Parasitol*. 94: 37-48
- Hajnóczky, G.; Csordas, G.; Das, S.; Garcia-Perez, C.; Saotome, M.; Roy, S.S.; Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*. 40: 553-560

- Hajnoczky, G.; Davies, E.; Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm.* 304: 445-454
- Hill, D., Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 8: 634-640
- Hiroko, P.; Indoa, M.D.; Hsiu-ChuanYenc, S.S.; Kazuo Tomitaa, T.N.; Masahiro Higuchie, Yasutoshi Kogaf, Toshihiko Ozawag, Hideyuki J. Majimaa (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion.* 7: 106-118
- Hunter, C.A., Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Rev Microbiol.* 10: 766-778
- Inestrosa, S.A.; Yagil, G.; Yaffe, D. (1971). Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation *in vitro*. *Dev Biol.* 25: 1-29
- Gutteridge, J.M.C, Halliwell, B. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* 19: 141-158
- Joiner; K.A.; Fuhrman, S.A.; Miettinen, H.M.; Kasper, L.H.; Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249: 641-646
- Jones, T.C.; Yeh, S.; Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med.* 136: 1157-1172
- Jorgensen, A.O.; Kalnins, V.I.; Zubrzycka, E.; MacLennan, D.H. (1977). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *J Cell Biol.* 74: 287-298
- Kirchhausen, T.; Macia, E.; Pelish, H.E. (2008). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Method Enzymol.* 438:77-93
- Konigsberg, I.R.; Sollmann, P.A; Mixer, L.O. (1978). The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol* 63: 11-26
- Labesse, G.; Gelin, M.; Bessin, Y.; Lebrun, M.; Papoin, J.; Cerdan, R.; Arold, S.T.; Dubremetz, J.F. (2009). ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity. *Structure.* 17: 139-146
- Laliberté, J.; Carruthers, V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 65:1900-1915
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M.M. (2008). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Cap. 19.1 In: *Principles of Biochemistry*, Lehninger, A. L. (org), New York - EUA, W. H. Freeman and Company, pp 708-722

- Lindsay, D.S.; Mitschler, R.R.; Toivio-Kinnucan, M.A.; Upton, S.J.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1993). Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Am J Vet Res* 54: 1663-1667
- Linkhart, T.A.; Clegg, C.H.; Hauschka, S.D. (1981). Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev Biol.* 86: 19-30
- Magno, R.C.; Lemgruber, L.; Vommaro, R.C.; De Souza, W.; Attias, M. (2005a). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Techn.* 67: 45-52
- Magno, R.C.; Straker, L.C.; De Souza, W.; Attias, M. (2005b). Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal.* 11: 166-174
- McFadden, D.C.; Tomavo, S.; Berry, E.A.; Boothroyd, J.C. (2000). Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Qo domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol Biochem Parasitol.* 108: 1-12
- Meirelles, M.N.L.; Araújo-Jorge, T.C.; Miranda, C.F.; De Souza, W.; Barbosa, H.S. (1986). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis "in vitro". *Eur J Cell Biol.* 41: 198-206
- Mercier, C.; Dubremetz, J.F.; Rauscher, B.; Lecoedier, L.; Sibley, L.D.; Cesbron-DeLauw, M.F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell.* 13: 2397-2409
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev.* 41: 445-501
- Montoya, J.G.; Boothroyd, J.C.; Kovacs, J.A. (2010). *Toxoplasma gondii*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill L (Ed.) Elsevier, PA, USA, 3495-3526
- Mordue, D.G.; Desai, N.; Dustin, M.; Sibley, D.L. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* 190: 1783-1792
- Mordue, D.G.; Sibley, L.D. (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immun.* 159: 4452-4459
- Morisaki, J.H.; Heuser, J.E.; Sibley, L.D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Science.* 108: 2457-2464

- Moura, M.A.; Amendoeira, M.R.R.; Barbosa, H.S. (2009). Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 862-864
- Nakaar, V.; Ngô, H.M.; Aaronson, E.P.; Coppens, I.; Stedman, T.T.; Joiner, K.A. (2003). Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Science*. 116: 2311-2320
- Nam, H.W. (2009). GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol*. 47: 29-37
- Nicolle, C., Manceaux, L. (1908). Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Seances Acad. Sci*. 147: 763-766
- Nicolle, C. eManceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Seances Acad Sci*. 148: 369-372
- Oz, H.S. e Tobin, T. (2012). Atovaquone ameliorate gastrointestinal Toxoplasmosis complications in a pregnancy model. *Med Sci Monit*. 18: 337-345
- Padron, E.; Painter, J.S.; Kunigal, S.; Mailloux, A.W.; McGraw, K.; McDaniel, J.M.; Kim, E.; Bebbington, C.; Baer, M.; Yarranton, G.; Lancet, J.; Komrokji, R.S.; Abdel-Wahab, O.; List, A.F.; Epling-Burnette, P.K. (2013). GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 121: 5068-5077
- Pappas, G.; Roussos, N.; Falagas, M.E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 39: 1385-1394
- Park, M.H.; Jo, M.; Won, D.; Song, H.S.; Han, S.B.; Song, M.J.; Hong, J.T. (2012). Snake venom toxin from *vipera lebetina turanica* induces apoptosis of colon cancer cells via upregulation of ROS- and JNK-mediated death receptor expression. *BMC Cancer*. 12: 228-234
- Parys, J.B. (2014). The IP3 Receptor as a hub for Bcl-2 family proteins in cell death control and beyond. *Science Signaling* 7: 312
- Peng, H.J.; Chen, X.G.; Lindsay, D.S. (2011). A Review: competence, compromise, and concomitance - reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J Parasitol*. 97: 620-628
- Pernas, L., Boothroyd, J.C. (2010). Association of host mitochondria with the parasitophorous vacuole during *Toxoplasma* infection is not dependent on rhoptry proteins ROP2/8. *Int J Parasitol*. 40: 1367-1371
- Peterson, C.M.; Johannsen, D.L.; Ravussin, E. (2012). Skeletal muscle mitochondria and aging: A Review. *J Aging Res*. 2012: 194821

- Pinon, J.M.; Dumon, H.; Chemla, C. (2001). Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol.* 39: 2267-2271
- Reese, M.L., Boothroyd, J.C. (2009). A helical membrane-binding domain targets the Toxoplasma ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic.* 10: 1458-1470
- Remington, J.S.; Miller, M.J.; Brownlee, I. (1968). IgM antibodies in acute toxoplasmosis: Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics.* 41: 1082-1091
- Robert-Gangneux, F., Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol.* 25: 264-96
- Santo-Domingo, J., Demarex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Bioch Bioph Acta.* 1797: 907-912
- Schiaffino, S.; Margreth, A. (1969). Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J Cell Biol.* 41: 855-875
- Schwab, J.C.; Beckers, C.J.M.; Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 509-513
- Serranti, D.; Buonsenso, D.; Valentini, P. (2011). Congenital toxoplasmosis treatment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 15: 193-198
- Shainberg, A.; Yagil, G.; Yaffe, D. (1969). Control of myogenesis in vitro by Ca⁺⁺ concentration in nutritional medium. *Exp Cell Res* 58: 163-167
- Sharma, A.; Santos, I.O.; Gaur, P.; Ferreira, V.F.; Garcia, C.R.S.; da Rocha, D.R. (2013). Addition of thiols to o-quinonemethide: new 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl [1,4] naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur J Med Chem* 59: 48-53
- Shen, B., Sibley, L.D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol* 15: 449-455
- Silva, C.L. (2013). Estudo do metabolismo mitocondrial da resposta anti-apoptótica de células endoteliais humanas durante a evolução da infecção por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. (Dissertação) Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. 89 p
- Sinai, A.P. (2008). Biogenesis and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem.* 47: 155-164

- Sinai, A.P., Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 154: 95-108
- Sinai, A.P.; Webster, P.; Joiner, K.A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.* 110: 2117-2128
- Sobrevals, L.; Mato-Berciano, A.; Urtasun, N.; Mazo, A.; Fillat, C. (2014). uPAR-controlled oncolytic adenoviruses eliminate cancer stem cells in human pancreatic tumors. *Stem Cell Res.* 12:1-10
- Soldati-Favre D. (2010). *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol Microbiol.* 15: 457-463
- Spät, A.; Szandaa, G.; Csordásc, G., Hajnóczkyc, G. (2008). High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signaling. *Cell Calcium.* 44: 51-63
- Speer, C.A., Dubey, J.P. (2005). Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.* 35: 193-206
- Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci São Paulo.* 3: 109-112.
- Tandon, P.; Gallo, C.A.; Khatri, S.; Barger, J.F.; Yepiskoposyan, H.; Plas, D.R. (2011). Requirement for ribosomal protein S6 kinase 1 to mediate glycolysis and apoptosis resistance induced by Pten deficiency. *Proc Natl Acad Sci.* 108: 2361-2365
- Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258
- Tomavo, S., Broothroyd, J.C. (1995). Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 25: 1293-1299
- Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., Uyemura, S.A., Zhong, L., Moreno, S.N.J. (1998). Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Cell* 47: 31040-31047
- Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., Xu, X., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Yu, L., Shen, J. (2012). Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. *Int J Food Microbiol.* 157: 393-397.

- Weiss, L.M., Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol.* 39:895-901.
- Weiss, L.M. e Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 5: 391-405
- Woke, P.A.; Jacobs, L.; Jones, F.E.; Melton, M.L. (1953). Experimental results on possible arthropod transmission of toxoplasmosis. *J Parasitol* 39: 523-532
- Yaffe, D., Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 270: 725-727
- Yamamoto, M. e Takeda, K. (2012). Inhibition of ATF6 β -dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence.* 3: 77-80