

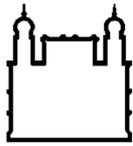
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

PAPEL DA EXPOSIÇÃO DA FOSFATIDILSERINA NA INFECÇÃO
E DESTINO INTRACELULAR DO *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

RAFAEL FIGUEIRA SOARES

Rio de Janeiro
Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RAFAEL FIGUEIRA SOARES

**PAPEL DA EXPOSIÇÃO DA FOSFATIDILSERINA NA INFECÇÃO E
DESTINO INTRACELULAR DO *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
Março de 2014

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

S676 Soares, Rafael Figueira

Papel da exposição da fosfatidilserina na infecção e destino intracelular do *Toxoplasma gondii* em células musculares esqueléticas / Rafael Figueira Soares. – Rio de Janeiro, 2014.

xv, 77 f. : il. ; 30 cm.

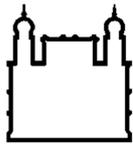
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 64-77

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Fosfatidilserina. 3. Cisto. 4. Cistogênese. 5. Bradizoítos. I. Título.

CDD 616.936j

Esta tese foi desenvolvida sob a orientação da Dra. Helene Santos Barbosa no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ e teve o apoio financeiro das seguintes entidades: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio Estratégico à Pesquisa (PAPES VI-Fiocruz), Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) e Instituto Oswaldo Cruz (IOC).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Rafael Figueira Soares

**PAPEL DA EXPOSIÇÃO DA FOSFATIDILSERINA NA INFECÇÃO E DESTINO
INTRACELULAR DO *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS**

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Helene Santos Barbosa

Aprovada em: 26/03/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Maria Regina Reis Amendoeira – IOC - Fiocruz - Presidente

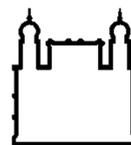
Prof. Dra. Laís de Carvalho – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dra. Kátia da Silva Calabrese – IOC - Fiocruz

Prof. Dr. Erick Vaz Guimarães - IOC - Fiocruz - Suplente

**Prof. Dra. Ana Carolina Stumbo – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ
- Suplente**

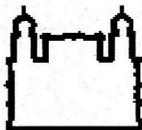
Rio de Janeiro, 26 de Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos que a defesa pública da dissertação de mestrado em Biologia Parasitária, área de concentração: Biologia, de Rafael Figueira Soares, realizou-se no vigésimo sexto dia do mês de março de dois mil e quatorze, às dez horas, no Auditório do Pavilhão Carlos Chagas.

Título da dissertação de mestrado: **“Papel da exposição da fosfatidilserina na infecção e destino intracelular do *TOXOPLASMA GONDII* em células musculares esqueléticas”**

Orientação: Dr^a Helene Santos Barbosa

Revisão: Dr^a Maria Regina Reis Amendoeira

Banca Examinadora: Dr^a Maria Regina Reis Amendoeira – IOC/Fiocruz (Presidente)

Dr^a Katia da Silva Calabrese – IOC/Fiocruz (Membro titular)

Dr^a Ana Carolina Stumbo Machado – UERJ (Membro titular)

Dr^a Lais de Carvalho – UERJ (Suplente)

Dr. Erick Vaz Guimarães - IOC/Fiocruz (Suplente)

Informamos ainda que o referido aluno deve cumprir exigências previstas em regimento da Pós-graduação em Biologia Parasitária para a obtenção de seu título.

Rio de Janeiro, 26 de março de 2014.


 Coordenação do Programa de Pós-graduação
 Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz

AGRADECIMENTOS

À Dra. Helene S. Barbosa pela orientação, pela dedicação e compromisso.

À Sandra Maria de Oliveira Souza pelo excelente apoio, por toda a sua ajuda em inúmeros momentos, seus conselhos, companheirismo e dedicação.

Ao Dr. Sergio Seabra e Thiago dos Santos pela colaboração, principalmente com as imagens de confocal.

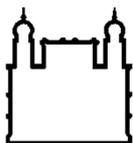
À minha família por apoio, ajuda durante esses dois anos e amor dedicado.

Ao Henrique Carneiro por sua amizade, companheirismo, pelas conversas de apoio e distração.

À equipe do LBE pelas amizades, pelos momentos de distração, pelos sorrisos e pelo apoio em momentos difíceis.

Aos colegas de curso pela cumplicidade, parceria e afetividade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.



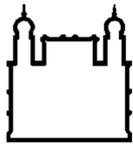
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ**PAPEL DA EXPOSIÇÃO DA FOSFATIDILSERINA NA INFECÇÃO E DESTINO INTRACELULAR DO *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS****RESUMO****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA****Rafael Figueira Soares**

A fosfatidilserina (PS) é conhecida por seu papel na regulação da apoptose e interferir em várias vias de sinalização celular. Por meio da exposição da PS, as células apoptóticas são internalizadas de forma eficiente por fagócitos, prevenindo uma resposta inflamatória. Assim, durante a evolução, alguns protozoários se utilizaram do processo chamado de “mimetismo apoptótico” para a evasão do sistema imune do hospedeiro. O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório e agente etiológico da toxoplasmose. Em taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, cepa do tipo I, virulenta, cerca de 50% dos parasitos expressam PS na sua superfície. No presente trabalho foram empregadas formas bradizoítas e taquizoítas de cepa ME49, a fim de elucidar a participação das subpopulações de *T. gondii*, PS positivas e negativas, na infecção de células musculares esqueléticas e seu papel no desenvolvimento da cistogênese, *in vitro*. Para essas análises os parasitos (cistos, taquizoítos e bradizoítos) incubados com anexina-FITIC foram analisados por técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A parede cística e o interior dos cistos teciduais de *T. gondii* foram positivos para anexina, enquanto os taquizoítos e bradizoítos apresentaram subpopulações que expõem ou não PS em sua membrana. A infecção de células hospedeiras por essas subpopulações de parasitos foi testada e quantificada em culturas de células musculares esqueléticas. As infecções e proliferação dos parasitos foram maiores na população total de taquizoítos em comparação com as suas subpopulações. Em infecções com bradizoítos utilizando população total e PS⁺ não se observou diferenças significativas, enquanto a infecção da subpopulação PS⁻ foi significativamente menor. Quanto ao desenvolvimento da cistogênese, a infecção com taquizoítos não gerou a formação de cistos teciduais, enquanto células infectadas com bradizoítos da população total e da PS⁺ foram capazes de alta indução da cistogênese comparada à população PS⁻. Esses dados evidenciam a participação da exposição de PS em infecções pelo *T. gondii* e seu destino intracelular, mostrando que a exposição de PS é um fator importante que favorece o encistamento espontâneo em células musculares esqueléticas quando as culturas foram infectadas com bradizoítos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROLE OF PHOSPHATIDYLSERINE EXPOSE ON THE INFECTION AND FATE OF *Toxoplasma gondii* IN SKELETAL MUSCLE CELLS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Rafael Figueira Soares

Phosphatidylserine (PS) is known for its role in regulating apoptosis and interferes with several cellular signaling pathways. Apoptotic cells, which exposure PS, are internalized efficiently by phagocytes, preventing an inflammatory response. Thus, during evolution, some protozoa use the process called "apoptotic mimicry" for evasion of the host immune system. *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite and the causative agent of toxoplasmosis. In tachyzoites of *T. gondii* RH strain, type I virulent, about 50% of the parasites have PS on their surface. In the present work bradyzoites and tachyzoites forms of ME49 strain, type II avirulent, were employed in order to elucidate the involvement of subpopulations of *T. gondii* expressing positive and negative PS, during infection of skeletal muscle cells and its role in the development of cystogenesis, *in vitro*. For these assays, parasites (cysts, tachyzoites and bradyzoites) were incubated with annexin-FITIC and analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. Cyst wall and the matrix of tissue cysts were positive for annexin, while tachyzoites and bradyzoites showed subpopulations exposing or not PS on their surface. The able of infection and proliferation of parasites were highest in the total population of tachyzoites compared with their subpopulations. In infections with bradyzoites was observed that total and PS⁺ populations showed no significant differences, while the PS⁻ was significantly lower. Regarding the development of cystogenesis, infection with tachyzoites did not generate the formation of tissue cysts while bradyzoites, total population and PS⁺ were capable of inducing high cystogenesis compared to population PS⁻. These data show the involvement of PS exposure in infections with *T. gondii* and its intracellular fate, showing that exposure of PS is an important factor favoring the spontaneous encystment in skeletal muscle cells when the cell cultures were infected with bradyzoites.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.2. Ciclo de vida e transmissão	3
1.2.1. Fase Sexuada	4
1.2.2. Fase Assexuada	3
1.3. Toxoplasmose	5
1.4. Interação <i>T. gondii</i> – célula hospedeira	6
1.4.1. Ciclo lítico: adesão, invasão e egresso	6
1.4.2. Cistogênese	10
1.5. Tecido muscular esquelético	12
1.5.1. Miogênese	12
1.5.2. Cultura primária de células musculares esqueléticas	13
1.6 Fosfatidilserina	15
1.6.1. Identificação, biossíntese, degradação e distribuição celular	15
1.6.2. Funções biológicas e detecção	17
1.6.3. Fosfatidilserina em patógenos e interação com células hospedeiras	19
1.6.4. Comportamento de subpopulações PS ⁺ e PS ⁻ em <i>T. gondii</i>	20
1.7 Justificativa	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Manutenção e diferenciação de linhagem de mioblasto de camundongo (C2C12)	24
3.2. Cultura primária de células do músculo esquelético	25
3.3. Obtenção de cistos teciduais de <i>T. gondii</i>	26
3.4 Obtenção de bradizoítos de <i>T. gondii</i>	27

3.5. Obtenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	27
3.6. Análise por citometria de fluxo da exposição de PS em taquizoítos e bradizoítos de <i>T. gondii</i>	27
3.7. Isolamento das subpopulações de <i>T. gondii</i>	28
3.8. Interação bradizoítos de <i>T. gondii</i> e células musculares	28
3.9. Interação taquizoítos de <i>T. gondii</i> e células musculares	29
3.10. Microscopia de luz	30
3.11 Microscopia de Fluorescência	30
4. RESULTADOS	32
4.1. Detecção de fosfadilserina em parasitos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	32
4.1.1 Análise da exposição de PS em cistos por citometria de fluxo e microscopia confocal	32
4.1.2 Análise da exposição de PS em bradizoítos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência	36
4.1.3 Análise da exposição de PS em taquizoítos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência	38
4.2. Cinética de infecção de subpopulações com exposição ou não de fosfadilserina em <i>T. gondii</i> em células musculares esqueléticas	40
4.2.1 Análise da infecção de subpopulações PS ⁺ e PS ⁻ de bradizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49 em culturas de linhagem de células musculares esqueléticas (C2C12)	40
4.2.2 Análise da infecção de subpopulações PS ⁺ e PS ⁻ de taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49 em culturas primárias de células musculares esqueléticas	46
4.3 Destino intracelular de subpopulações PS ⁺ e PS ⁻ de bradizoítos de <i>T. gondii</i> em culturas de linhagem de células musculares esqueléticas (C2C12)	47
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Estrutura do taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
Fig. 1.2. Ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	3
Fig. 1.3. Modelo integrado de invasão do <i>T. gondii</i> em células hospedeiras	7
FIG. 1.4. Estrutura molecular da fosfoditilserina	15
Fig. 1.5. Mudanças controladas por transportadores de fosfolipídios	18
Fig. 1.6. Princípio do método de detecção de apoptose com anexina v	19
Fig. 4.1. Perfil da exposição de PS em cistos de <i>T. gondii</i> isolados do cérebro de camundongos após incubação com anexina V-FITC	32
Fig. 4.2. Cistos de <i>T. gondii</i> incubados com anexina V-FITC	34
Fig. 4.3. Marcação por fluorescência com anexina V-FITC	35
Fig. 4.4. Perfil da exposição de PS em bradizoítos	36
Fig. 4.5. Imagens de fluorescência de bradizoítos marcados com anexina v-FITIC	37
Fig. 4.6. Perfil da exposição de PS de taquizoítos de ME49	38
Fig. 4.7. Imagens de fluorescência de taquizoítos de <i>T. gondii</i> marcados com anexina v-FITIC e PI	39
Fig.4.8. Percentual de infecção com subpopulações de <i>T. gondii</i> em C2C12	41
Fig. 4.9. Índice de infecção com subpopulações de <i>T. gondii</i> em C2C12	42
Fig. 4.10. Aspecto da infecção com população total de bradizoítos da cepa ME49 em C2C12	43
Fig. 4.11. Aspectos da infecção com subpopulação PS ⁺ de bradizoítos de ME49 em C2C12	44
Fig. 4.12. Aspectos da infecção com subpopulação PS ⁻ de bradizoítos de ME49 em C2C12	45
Fig. 4.13. Percentual de células infectadas em infecção com subpopulação de taquizoítas de <i>T. gondii</i> em CME	46
Fig. 4.14. Índice de infecção com subpopulação de taquizoítos de <i>T. gondii</i> em CME	47
Fig. 4.15. Aspecto de culturas infectadas com subpopulações de taquizoítos de ME49 em CME após 12 dias de interação	48

Fig. 4.16 Quantificação total das lâminas quanto à cistogênese de <i>T. gondii</i> em C2C12	49
Fig. 4.17. Quantificação total das lâminas quanto ao desenvolvimento da cistogênese de <i>T. gondii</i> em C2C12	50
Fig. 4.18. Aspectos de culturas de células musculares esqueléticas infectadas com subpopulações de bradizoítos em C2C12	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A23187	Transportadora móvel de íons
AMA	Antígeno da membrana apical
BALB/c	Linhagem de camundongos
bHLH	Hélice-alça-hélice
BSA	Albumina sérica bovina
C2C12	Linhagem de mioblastos de camundongo
C57BL/6	Linhagens de camundongos
CDPKI	Proteína quinase com domínio semelhante à calmodulina
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CME	Célula Muscular Esquelética
DABCO	1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octano-trietilenodiamina
DAPI 4'	6-diamidino-2-fenilindole
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> aglutinina
DIC	Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial
DMEM F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GRA	Proteínas dos grânulos densos
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
IL	Interleucina
INF-	Interferon Gama
JM	Junção Móvel
LBE	Laboratório de Biologia Estrutural
MAM	Membranas associadas à mitocôndria
ME-49	Cepa avirulenta de <i>T. gondii</i>
MEF	Fator ativador de miócitos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Proteínas de micronemas
MRF	Fatores reguladores da miogênese
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo
Myf5	Fator Miogênico 5

MyoD Proteína de regulação da diferenciação muscular
MyoG Miogenina
Na⁺/K⁺ATPase Sódio/Potássio ATPase
NO Óxido Nítrico
OsO₄ Tetróxido de ósmio
PBS Tampão salina fosfato (phosphate buffered saline)
PC Fosfatidilcolina
PE Fosfatidiletanolamina
PFA Paraformaldeído
PI Iodeto de Propídio
PS Fosfatidilserina
PSD Fosfatidilserina descarboxilase
PSR Receptor de fosfatidilserina
PSS Fosfatidilserina sintase
RE Retículo endoplasmático
RH Cepa virulenta de *T. gondii*
RON Proteínas do pescoço das róptrias
RPO Proteína produzida pelas róptrias
SAG Antígeno de taquizoítos
SFB Soro Fetal Bovino
TGF-β Fator transformador de crescimento beta
Ts4705 Proteína do pescoço das róptrias
VP Vacúolo parasitóforo

1. Introdução

1.1 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, à Classe Sporozoea, à Subclasse Coccidia, à Ordem Eucoccidiorida, à Família Sarcocystidae e à Subfamília Toxoplasmatinae (Levine e cols, 1980; Current e cols, 1990; Cavalier-Smith, 1993). É o agente etiológico da toxoplasmose, descrito inicialmente por Nicolle e Manceaux em 1909, em um roedor encontrado na Tunísia. No Brasil, no mesmo ano, Splendore identificou o parasito em um coelho. Ambos os pesquisadores ressaltaram as semelhanças de *T. gondii* com *Leishmania*, tanto que Nicolle e Manceaux inicialmente propuseram chamar o seu novo parasito, de *Leishmania gondi* (revisto em McGovern e Wilson, 2013). O nome da espécie é oriundo do roedor norte africano o *Ctenodactylus gundi*, de onde foi isolado, e o gênero do grego *toxon* (arco) e *plasma* (forma) devido ao seu formato encurvado e crescente (Dubey, 2008; De Souza e cols., 2010). Após a década de 1930, o *T. gondii* foi encontrado em vários outros hospedeiros, especialmente em espécies aviárias (Dubey, 2008), Sabin em 1939 identificou que se tratava de uma só espécie.

Quanto a sua estrutura, o *T. gondii* se caracteriza por possuir um complexo apical composto de organelas secretórias especializadas como rôptrias e micronemas e de elementos do citoesqueleto, como anéis polares e o conóide. Além das organelas típicas dos eucariotos, o parasito ainda apresenta estruturas exclusivas dos Apicomplexas, como grânulos densos, grânulos de amilopectina (quase ausentes em taquizoítos) e apicoplasto (Fig. 1.1) (revisto em De Souza e cols., 2010).

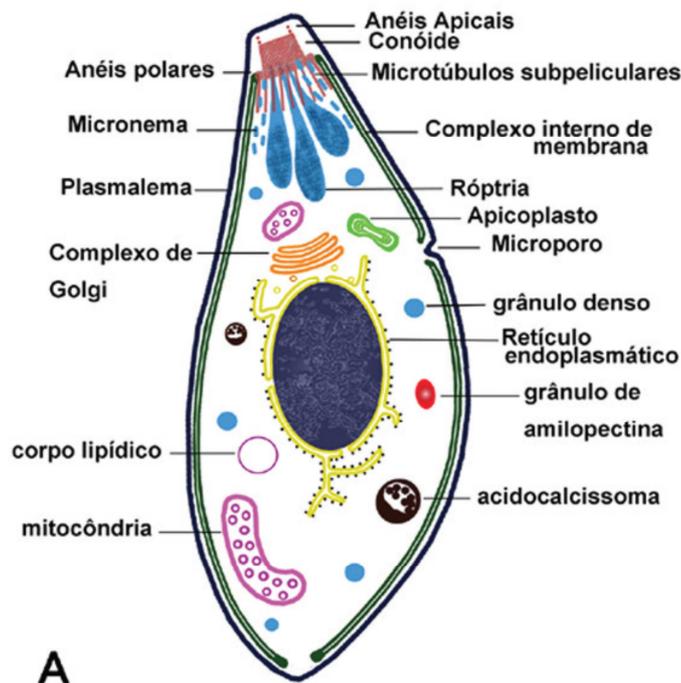


Figura 1.1 Morfologia ultraestrutural de taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Esquema mostra as principais estruturas e organelas que identificam o parasito. (De Souza e cols, 2010).

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo (item 1.2), pois o parasito transita entre os hospedeiros definitivos e os intermediários envolvendo três estágios infectivos: taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta, cada um desempenhando diferentes funções biológicas: a) Taquizoíta - forma proliferativa do parasito, pois se multiplica rapidamente por endodiogenia (Dubey e Jones, 2008). Célula polarizada alongada, semilunar, medindo aproximadamente 6 μm x 2 μm e apresenta região anterior afilada e a posterior arredondada (De Souza e cols., 2010), caracterizando a fase aguda da infecção; b) Bradizoíta - estágio presente no interior dos cistos, encontrado nos tecidos (Dubey e Jones, 2008). Os cistos teciduais presentes no cérebro são esferoidais e raramente atingem um diâmetro maior que 70 μm , enquanto os cistos intramusculares são alongados e podem apresentar até 100 μm de comprimento contendo centenas de bradizoítos no seu interior que medem cerca de 7 μm x 1.5 μm (Dubey e cols, 1998). Multiplicam-se mais lentamente, caracterizando a fase crônica da infecção (Dubey, 2008); c) Esporozoíta – forma infectiva produzida pelos hospedeiros definitivos (felídeos) durante o ciclo sexuado do parasito, encontrado no interior de oocistos e mede cerca de 6-8 μm x 2 μm (Dubey e cols., 1998).

1.2 Ciclo de vida e transmissão

O ciclo de vida do *T. gondii* apresenta uma fase sexuada e outra assexuada. (Fig. 1.2) A fase sexuada ocorre exclusivamente nos felídeos, enquanto a assexuada ocorre em aves e na maioria dos mamíferos de sangue quente, incluindo os felinos e o homem. Seu ciclo de vida completo só foi descoberto em 1970, quando foi constatado que os felinos eram o seu hospedeiro definitivo e que eliminavam através de suas fezes um estágio resistente no ambiente (ocistos) (Hutchinson e cols., 1971; revisto posteriormente por Dubey e cols., 1998 e Ferguson, 2009).

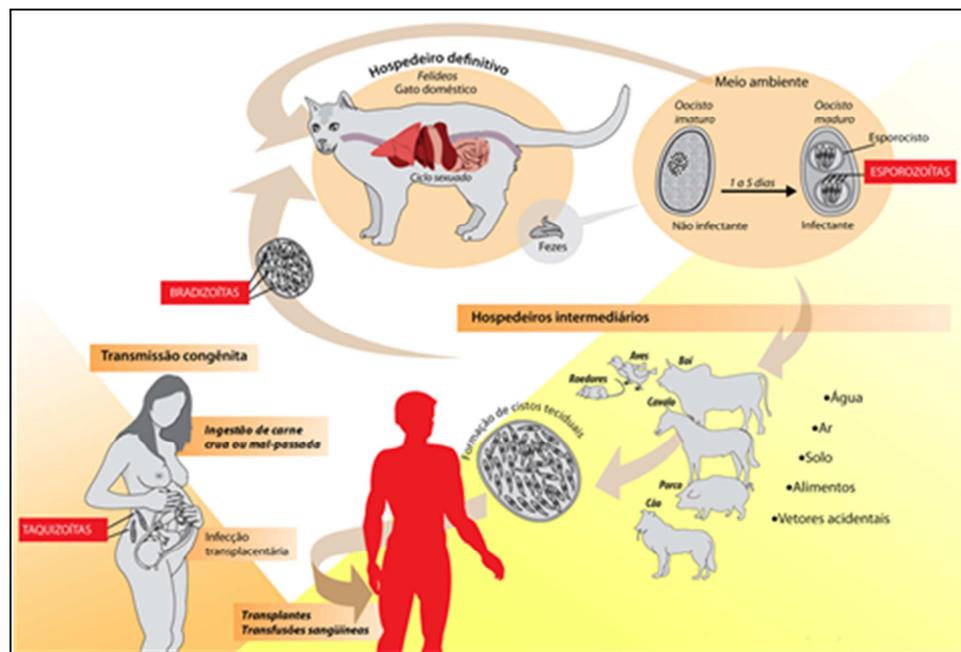


Fig. 1.2 Ciclo de vida do *T. gondii*: Ciclo biológico ilustrado do *Toxoplasma gondii* mostrando as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos (Moura e cols., 2009).

1.2.1 Fase Sexuada

A fase sexuada ocorre exclusivamente no intestino dos hospedeiros definitivos, membros da família Felidae. Os felinos, por meio do carnivorismo, se infectam principalmente ingerindo cistos teciduais de *T. gondii* presentes na carne de roedores e aves infectadas ou oocistos presentes no ambiente. O período pré-patente (intervalo de tempo para eliminar oocistos após a infecção inicial) e a frequência da liberação de oocistos dependem da forma infectante envolvida (Dubey, 1996). Após a ingestão de uma dessas formas infectantes, sob a ação

enzimática dos sucos gástrico e intestinal, ocorre o rompimento da parede dos cistos teciduais ou oocistos, liberando bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente, no intestino do hospedeiro, que penetram nas células epiteliais do intestino e iniciam o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii* (Dubey e Frenkel, 1972). Ocorrem cinco estágios enteroepiteliais ou esquizontes distintos de *T. gondii* (Tipos: A, B, C, D e E) que culminam com a produção dos macrogametas e microgametas, gametas femininos e masculinos, respectivamente (Dubey, 1998). Da fusão desses gametas resulta a formação de um zigoto diplóide (oocisto). A célula epitelial sofrerá rompimento, liberando os oocistos imaturos no ambiente, com as fezes do felino, contaminando o ar, a água, o solo e os alimentos, constituindo então, importantes fontes de infecção de mamíferos e aves. Esses oocistos levam de 1-21 dias para se tornarem infectivos e o oocisto tem no seu interior dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (Dubey e cols., 1998; revisto em Ferguson, 2009) (Fig.1.2)

1.2.2 Fase assexuada

Nos hospedeiros intermediários logo após a ingestão de cistos teciduais ou oocistos, no interior das células da lâmina própria do intestino ocorre a diferenciação dos bradizoítos e esporozoítos em taquizoítos, que se multiplicam por endodiogenia rápida, rompem essas células e alcançam a linfa e a circulação sanguínea distribuindo esses parasitos para diversos órgãos, infectando qualquer célula nucleada, onde segue sua multiplicação intracelular rápida (revisto em Jones e Dubey, 2012).

Fatores relacionados, principalmente, à resposta imunológica do hospedeiro levam a uma mudança no ritmo de multiplicação dos taquizoítos e ocorre a diferenciação em bradizoítos, cujo processo de endodiogenia ocorre de forma mais lenta. Estes são encontrados no interior de cistos, caracterizando a fase crônica da infecção (Dubey e Frenkel, 1998; revisto em Weiss e Kim, 2000). A infecção incide preferencialmente, no sistema nervoso central, musculaturas esquelética e cardíaca, entretanto, também pode ocorrer mais raramente em vísceras, como pulmão, fígado e rins (Tenter e cols., 2000; Skariah e cols., 2010; Cenci-Goga e cols., 2011). A transmissão assim se dá principalmente pela ingestão de carne crua ou mal passada contendo os cistos (revisto em Jones e Dubey, 2012).

O *T. gondii* também pode ser transmitido pela via transplacentária ao feto durante a infecção aguda de fêmeas no período de gestação (Kawazoe, 2005; revisto em Kravetz, 2013 e em Halonen e Weiss, 2013).

1.3 Toxoplasmose

A infecção toxoplásmica apresenta duas fases de infecção: aguda e crônica. A fase aguda se caracteriza pela presença predominante de formas taquizoítas, que apresentam crescimento rápido, replicam dentro de células com um ciclo celular de 6 a 8 h (*in vitro*), até sua saída da célula hospedeira para infectar células vizinhas, o que gera a ativação da resposta inflamatória pelo hospedeiro. É responsável pela transmissão congênita, uma vez que o taquizoíto consegue ultrapassar a barreira placentária e infectar o embrião. Nos animais infectados, taquizoítos diferenciam em bradizoítos e formam cistos nos tecidos, que aparecem entre 7 a 10 dias após a infecção. Esses cistos contêm bradizoítos e são encontrados predominantemente no sistema nervoso central e do tecido muscular, onde eles podem residir por toda vida do hospedeiro, sem gerar resposta inflamatória. O desenvolvimento destes cistos nos tecidos caracteriza a fase crônica da doença (revisto em Jones e Dubey, 2012).

Os indivíduos imunocompetentes raramente apresentam sintomas durante a infecção pelo *T. gondii*. Porém, em pacientes imunocomprometidos, o parasito pode, quando há a reativação dos cistos, causar neurotoxoplasmose ou toxoplasmose encefálica, entre outros agravos (Lalibert e Carruthers, 2008; Dubey e Jones, 2008). Além disso, miosites quer por infecção recente ou reativação dos cistos teciduais, também se manifestam, comprometendo a homeostase do tecido muscular (Hassene e cols., 2008). No caso da transmissão vertical, a mãe pode ser infectada durante a gravidez, sendo geralmente mais grave quando a infecção ocorre no primeiro trimestre. Esse tipo de infecção pode acarretar más formações congênicas no feto, levando ao aborto espontâneo, e à hidro ou microcefalia ou calcificações cerebrais. E ainda, patologias se desenvolvem após o nascimento da criança, como a toxoplasmose ocular que pode levar à cegueira (revisto em Carlier e cols., 2012 e em Kravetz, 2013).

1.4 Interação *T. gondii* – célula hospedeira

1.4.1 Ciclo lítico: adesão, invasão e egresso

Como uma das características biológicas intrínsecas do *T. gondii* é ser um parasito intracelular obrigatório, a invasão celular é um evento crítico para o sucesso do estabelecimento da infecção. Os parasitos do filo Apicomplexa apresentam uma estratégia comum de locomoção que depende do substrato, essa estratégia de locomoção é conhecida como mobilidade por deslizamento (“gliding”), usada para a migração entre tecidos e para a invasão da célula hospedeira (Sibley e cols., 1998; Barragan e cols., 2005; Heintzelman, 2006). Além disso, o processo de entrada é altamente orquestrado e dirigido pela maquinaria de actina-miosina do parasito (Dobrowolski e cols., 1997). Assim, parasitos que conseguem vencer essas barreiras biológicas integram os patógenos de maior importância para o homem, sob o ponto de vista patológico (Barragan e Sibley, 2003; Sibley, 2004).

Todas as etapas da interação *T. gondii*-célula hospedeira são mediadas molecularmente pelo parasito, utilizando um processo de multi etapas que depende da secreção regulada das adesinas (proteínas produzidas nos micronemas, as MIC) como ilustrado na figura 1.3. Esse processo adesivo à superfície da célula desencadeia a formação de complexos juncionais (JM) que são depois translocados ao longo do eixo do parasito, induzindo assim a invasão do parasito na célula por penetração ativa (Carruthers e cols., 1999; Jewett e Sibley, 2003; revisto em Carruthers e Boothroyd, 2007). A coordenação dessas atividades exige um controle cronometrado para a liberação de proteínas de superfície que medeiam a adesão e a invasão (Alexander e cols., 2005; Shen e Sibley, 2012; revisto em Cowper e cols., 2012; Mueller e cols., 2013). A conclusão da invasão celular exige que as interações moleculares estabelecidas durante a interação, em última instância sejam desfeitas. Então, esse desenlace se dá por meio da clivagem proteolítica das proteínas adesivas ao longo da membrana do corpo do parasito (Buguliskis e cols., 2010).

Os eventos da invasão do *T. gondii* na célula hospedeira envolvem algumas particularidades: (1) a penetração ativa do parasito (15 - 17 segundos) ocorre via polo anterior (conóide) que em contato com a superfície da célula hospedeira desencadeia a invaginação da membrana celular; (2) estabelecimento de um vacúolo parasitóforo (VP) não fusogênico, nicho no qual o parasito vai permanecer durante todo o seu ciclo intracelular (Sibley e cols, 1985; Mordue e cols 1999); (3)

extensa modificação da membrana do vacúolo parasitóforo para a aquisição de nutrientes; (4) proliferação intracelular por endodiogenia e, (5) conversão de taquizoíto para bradizoíto e o estabelecimento da cistogênese e/ou o egresso dos taquizoíto da célula hospedeira.

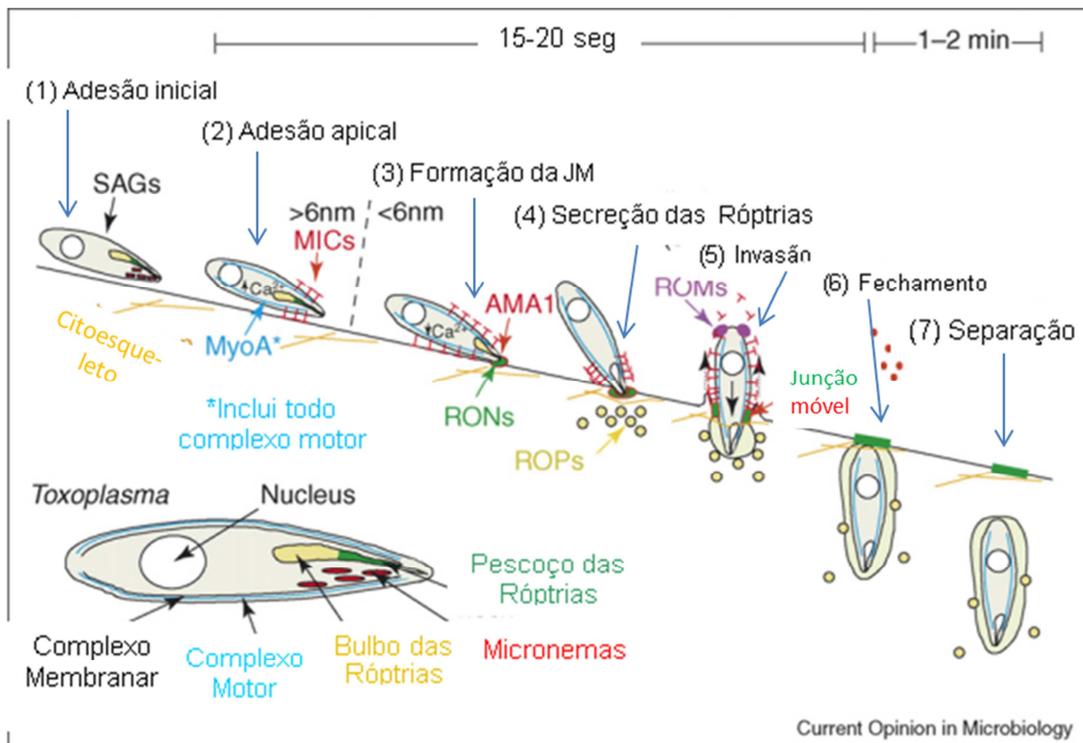


Fig. 1.3. Modelo integrado de invasão do *Toxoplasma gondii* em células hospedeiras e apresenta sete etapas: 1) A fixação inicial (pode ser reversível) envolve o reconhecimento de receptores de superfície por SAGs. Esta interação precede a 2) adesão apical inicial, com a secreção das MICs dependentes de cálcio (vermelho, em forma de T) e a sua acumulação na superfície apical. 3) A JM (verde e anel vermelho) é formada pela liberação de proteínas RON (verde), que associam-se com derivados de micronemas AMA1 (círculos vermelhos) durante ou após secreção. Estas proteínas criam uma ligação íntima de < 6 nm, sob a forma de um pequeno anel. 4) A seguir, ROPs (dourada) são secretadas no citoplasma da célula hospedeira na região onde irá ocorrer a invasão. 5) Algumas ROP's permanecem associadas a pequenas vesículas que se fundem com o MPV (se forma durante a invasão do parasito); 5) O parasito penetra ativamente na célula por movimentos que o puxam (setas laterais) através de MICs transmembranares e/ou através do anel AMA1-RON. 6) A invaginação membrana plasmática da célula hospedeira então se forma para criar o VP; 5) As proteases ROM (roxo) são responsáveis pelo derramamento das MICs da extremidade posterior. 6) Durante a invasão, o VP atravessa o citoesqueleto do hospedeiro (laranja), provavelmente envolvendo algum tipo de ancoramento às moléculas do citoesqueleto. Considerando que o parasito realiza as etapas 2-5 em 15-20 segundos, as etapas finais fechamento e separação (6-7), exigem 1-2 min para completar a entrada do parasito. 7) O encerramento envolve fissão do MVP e a membrana plasmática hospedeiro e esta etapa pode ser facilitada pelo complexo MJ residual. O inseto mostra um taquizoíto para ilustrar seus compartimentos e estruturas (adaptado de Carruthers e Boothroyd, 2007).

Durante a secreção coordenada das róptrias e micronemas foi identificado um complexo de quatro proteínas: TgAMA1, RON2, RON4 e a Ts4705. Pelo menos duas destas proteínas, a TgAMA1 e a RON4 interagem no processo de entrada do

parasito na célula hospedeira, localizando-se na junção móvel, onde as membranas do *T. gondii* e do hospedeiro ficam em íntimo contato (Alexander e cols., 2005). A JM serve para excluir proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira, dando início à formação da membrana do vacúolo parasitóforo (Mordue e cols., 1999; Lebrun e cols., 2005; revisto em Carruthers e Boothroyd, 2007). Outras proteínas das róprias são inseridas na MVP, contribuindo para sua formação durante a invasão da célula hospedeira pelo *Toxoplasma* (Boothroyd e Dubremetz, 2008; Shen e Sibley, 2012; revisto em Cowper e cols., 2012; Mueller e cols., 2013).

Durante o processo de multiplicação do parasito, ocorre um aumento significativo da MVP. Alguns autores atribuem este aumento à incorporação de moléculas da célula hospedeira, provenientes de organelas associadas, como o retículo endoplasmático e mitocôndria (Melo e de Souza, 1997; Gomes e cols., 2014). Acredita-se que a RPO2 proteína produzida pelas róprias, seja a responsável pela associação das mitocôndrias com a MVP (Sinai e Joiner, 2001).

Vários estudos sugerem que as proteínas dos grânulos densos participem na modificação do VP, de sua membrana e da sua interação com o citosol da célula hospedeira. Essas proteínas são secretadas logo após os parasitos invadirem as células (Brossier e Sibley, 2005). Tem sido demonstrado que estariam diretamente envolvidas no amadurecimento deste vacúolo (Cesbron-Delauw e cols., 2008) e mais recentemente, atuando no egresso do parasito (Okada e cols., 2013). No espaço intravacuolar, por exemplo, é formada uma rede de nanotúbulos que pode estar funcionando como uma via de intercâmbio de moléculas entre o citoplasma da célula hospedeira e o protozoário (Sibley e cols., 1995). As proteínas GRA2, GRA3 e GRA6 possuem um papel fundamental na formação dos nanotúbulos, sendo a GRA2 e GRA3 envolvidas na organização de vesículas que após alongamento darão origem à rede intravacuolar madura, e a GRA6 na estabilização da membrana tubular desta rede (Mercier e cols., 2002, 2005). A GRA7 encontrada na MVP está sendo relacionada com a formação de “condutos tubulares”. Esses túbulos, derivados da invaginação da MVP, estariam atuando na entrega de lipídios, através do espaço vacuolar para o parasito (Coppens e cols., 2006).

A formação e desenvolvimento do VP, bem como a modificação de sua membrana, envolvem moléculas de ambas as células (parasito e célula hospedeira)

atuando na proteção do *T. gondii* contra a ação de radicais livres, variações de pH, osmolaridade e evitando também, os mecanismos de defesa do hospedeiro (Pacheco-Soares e De Souza, 1998; Laliberté e Carruthers 2008; Sinai, 2008). Outra vantagem é que este vacúolo, diferentemente dos fagossomos não se funde com os compartimentos da via endocítica (Joiner e cols., 1990; Mordue e cols., 1999; Sinai, 2008). O vacúolo parasitóforo fornece ao *T. gondii* ambiente protegido para seu crescimento e desenvolvimento (Sibley e cols., 1985; Mordue e cols., 1999).

O egresso do parasito que caracteriza o ciclo lítico do *T. gondii* é um processo rápido (menos de 60 segundos) (revisto em Black e Boothroyd, 2000). Esse processo requer que os parasitos atravessem a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), o citosol, a malha do citoesqueleto da célula hospedeira e finalmente a membrana plasmática, para atingir o espaço extracelular (Caldas e cols., 2010; Shen e Sibley, 2012; revisto em Peng e cols., 2011; Cowper e cols., 2012). Em recente revisão feita por Blackman e Carruthers (2013) eles discutem o papel de moléculas efetoras que medeiam o rompimento das membranas que envolvem o parasito intracelular e a maneira como a membrana se rompe, levando finalmente à liberação das formas invasivas do parasito.

Ainda não foram desvendados os genes responsáveis pelo egresso do parasito, nem os eventos específicos e sinais que levam este parasito a evadir da célula hospedeira. Especula-se que o egresso envolva as mesmas moléculas e os mesmos mecanismos utilizados pelo protozoário durante a invasão dessas células, permitindo que este se mova rapidamente da célula lesada para uma nova célula, se expondo pouco ao ambiente extracelular (Hoff e Carruthers, 2002). Em culturas de células, o egresso do *T. gondii* ocorre após cinco ou seis divisões ou aproximadamente em 48 - 72 horas. O egresso não é sincronizado e estando fora da célula hospedeira, os parasitos podem imediatamente invadir células vizinhas para começar um novo ciclo de replicação. Durante os processos de invasão e egresso do *T. gondii* da célula hospedeira, ocorrem alguns eventos, tais como: aumento na concentração de Ca^{+2} , diminuição na concentração de K^{+} , ação da TgCDPKI (proteína quinase com domínio semelhante à calmodulina), motilidade, extrusão do conóide e constrição com formação da JM (Hoff e Carruthers, 2002).

O cálcio é um íon sinalizador envolvido em muitos processos fisiológicos das células eucariotas. No *T. gondii* o incremento da concentração de cálcio está associado às mudanças morfológicas, a secreção de proteínas envolvidas na invasão celular e ao rápido egresso das células hospedeiras. Experimentos com ionóforo A23187 mostram que a invasão e o egresso estão relacionados com o fluxo de Ca^{+2} . O tratamento com A23187 induz a rápida evasão dos parasitos intracelulares do vacúolo parasitóforo, estimulando a secreção das proteínas dos micronemas e atua também na mobilização dos estoques internos de Ca^{+2} do parasito como mitocôndrias, retículo endoplasmático, grânulos densos e acidocalcisoma (Moreno e Zhong, 1996; Carruthers e Sibley, 1999; Monteiro e cols., 2001), promovendo o aumento do deslizamento e a extrusão do conóide, processos esses sensíveis ao Ca^{+2} . Assim como no egresso natural, parasitos expostos ao ionóforo tornam-se móveis e mudam sua morfologia antes do egresso, sugerindo que este é um processo ativo que requer a participação do citoesqueleto e da maquinaria móvel do protozoário (Black e Boothroyd, 2000). Experimentos com quelante de cálcio revelaram que o egresso ocorre, mesmo quando todo o cálcio da célula hospedeira e do vacúolo é depletado, sugerindo que o parasito utilize seus próprios reservatórios de Ca^{+2} neste processo (Black e Boothroyd, 2000; Moudy e cols., 2001).

Durante todo o processo de interação, o *T. gondii* regula a célula hospedeira por meio das modulações morfológica, fisiológica, imunológica e genética. Após a invasão e desenvolvimento, as células hospedeiras são moduladas para manter um equilíbrio delicado entre a facilitação e eliminação da infecção.

1.4.2 Cistogênese

Os mecanismos que induzem ao encistamento tecidual ou a reativação da infecção pelo *T. gondii* ainda não são conhecidos. Culturas celulares têm sido empregadas para reproduzir a cistogênese *in vitro* (Hoff e cols., 1977; Jones e cols., 1986; Dardé e cols., 1989; Lindsay e cols., 1991; McHugh e cols., 1993; Lindsay e cols., 1993; Ricard e cols., 1999; Guimarães e cols., 2008, 2009; revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a, b; Paredes-Santos e cols.,

2013; De Muno e cols., 2014). A maioria destes estudos empregada linhagens celulares e utilizam condições de estresse como pH alcalino, drogas, altas temperaturas (Bohne e cols., 1993, 1994,1996; Soête e cols., 1994; Gross e Pohl, 1996, Ferreira-da-Silva e cols., 2008) e possibilitam a análise da interconversão entre bradizoítos e taquizoítos (Soête e cols., 1993; Bohne e cols., 1994; Soête e Dubremetz, 1996; Lane cols., 1996; Guimarães e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a, b).

O processo da cistogênese do *Toxoplasma* implica em: (i) alterações na superfície do parasito, (ii) alterações no seu metabolismo e, (iii) indução de genes associados à resposta de estresse (revisto em Bohne e cols., 1999). Os antígenos de superfície SAG1 e SAG2 desaparecem ao longo da diferenciação, não sendo muito clara a função biológica destas alterações na expressão de moléculas de superfície do parasito. A mudança da forma replicativa rápida dos taquizoítos, que requer alto consumo de energia, para bradizoítos que se multiplicam lentamente também é acompanhada por uma alteração no metabolismo do parasito, ocorrendo um armazenamento de energia sob a forma de grânulos de amilopectina, numerosos em bradizoítos e muitas vezes ausentes em taquizoítos (revisto em Bohne e cols., 1999).

Muito embora a geração do conhecimento da biologia do *T. gondii* e da toxoplasmose tenha envolvido nas últimas três décadas muitos grupos de pesquisa, o percentual de estudos que concentram a atenção na cistogênese e cistos teciduais é relativamente muito baixo. Essa lacuna existe, apesar da sua importância na disseminação, persistência da infecção e do seu papel como parasito oportunista durante a imunossupressão do hospedeiro, com a reativação de cistos teciduais e agravamento do quadro clínico de pacientes com HIV, transplantados, portadores de tumores malignos, entre outras formas de imunossupressão. Os ensaios experimentais *in vitro* analisam na sua grande maioria linhagens celulares das mais diversas origens. O emprego de culturas primárias de células envolvidas na infecção crônica de *T. gondii* principalmente, os tecidos neurais e musculares, têm recebido pouca atenção (Frenkel, 1990; Lindsay e cols., 1991; McHugh e cols., 1993; Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008, 2009; revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a, b; Gomes e cols., 2011; 2014; Takács e cols., 2012).

Em função desses parâmetros, o presente trabalho utilizou: (a) célula muscular esquelética (uma das células de eleição para o encistamento do parasito *in vivo*), a partir de cultura primária de embriões de camundongos e linhagens celulares de músculo esquelético, como modelo de estudo da interação do *T. gondii*, com ênfase na cistogênese.

1.5 Tecido muscular esquelético

1.5.1 Miogênese

O tecido muscular é formado a partir dos somitos, que são células originadas do mesoderma paraxial. Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre uma cascata de eventos que regulam as células progenitoras da linhagem miogênica por sinais positivos e negativos dos tecidos que as circundam, tais como, o tubo neural, notocorda e ectoderme dorsal e lateral (Dubinska-Magiera e cols., 2014). Assim, a partir dos somitos, algumas células precursoras miogênicas migram para os tecidos conjuntivos adjacentes, onde se diferenciam em mioblastos, interrompendo o ciclo celular. A partir daí, sintetizam proteínas músculo-específicas, se fusionam para formar os miotubos primários e secundários e a subsequente constituição das fibras musculares (revisto em Pownall e cols., 2002; Pourquié, 2003; revisto em Chargé e Rudnicki, 2004; Sanger e cols., 2006).

A diferenciação das células progenitoras do tecido muscular esquelético e a especificação para linhagens miogênicas é controlada por fatores básicos de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH) que induzem a expressão de fatores reguladores da miogênese (MRFs) que, juntamente com as proteínas da família MEF-2 (“Myocyte Enhancer Factor 2”), mantém o programa de transcrição miogênica. A rede de regulação transcricional de células embrionárias tem os quatro fatores de regulação miogênica os MRFs: Myf5, MyoD, MRF4 e MyoG (miogenina) (revisto em Moncaut e cols., 2013).

A expressão das proteínas MRFs durante o desenvolvimento do músculo esquelético está sob rigoroso controle temporal e espacial. Por exemplo, a expressão de MyoD e Myf-5 são fatores primários e agem na determinação de precursores miogênicos, enquanto MyoG e MRF-4 são fatores de diferenciação que agem na formação terminal das fibras musculares. Além do grupo gênico MyoD, os

fatores de transcrição MEF2 desempenham papel importante na ativação do gene muscular (Pownall e cols., 2002; Pourquié, 2003; Berkes e Tapscoot, 2005). Estudos tem demonstrado que a dinâmica dos Myf5 se expressa antes da indução de destino miogênico das células precursoras e, com base nas informações obtidas de camundongos nulos para Myf5, hoje se considera este ser um fator determinante. Da mesma forma, a expressão de MyoD numa base de Myf5 impulsiona as células da linhagem miogênica, embora com um atraso em algumas populações (Tajbakhsh e cols., 1997). As expressões de MRF4 e MyoG são mais tardias e foram tradicionalmente classificadas como genes envolvidos no processo de diferenciação. No entanto, se sabe que MRF4 é expressa ao mesmo tempo que se não antes, e que, na ausência de Myf5 e MyoD, a MRF4 é capaz de induzir miogênese, indicando que MRF4 deveria ser reclassificada como tendo ambas as atividades de ativadores e de diferenciação (Summerbell e cols., 2002; Kassari-Duchossoy e cols., 2004). Esses fatores (MRFs) formam um núcleo da cascata de transcrição que leva ao fenótipo do músculo esquelético e, por conseguinte, neste campo algumas questões fundamentais têm sido investigadas, de como esses genes são ativados no início da miogênese no embrião e como que as proteínas codificadas funcionam para induzir o programa de diferenciação e subsequente organogênese (revisado em Moncaut e cols., 2013).

As células musculares tem um papel de fundamental importância como modelo celular de estudo, tendo em vista que estão envolvidas na fase crônica da infecção toxoplásmica. Ocorrendo uma imunossupressão, os cistos teciduais, presentes principalmente nas células musculares do hospedeiro, são reativados, se rompendo e liberando os bradizoítos que irão infectar novas células, reproduzindo um novo ciclo da fase aguda da doença (Wang e cols., 2011).

1.5.2 Cultura Primária de Células Musculares Esqueléticas

O cultivo primário de células musculares esqueléticas em monocamadas teve início na década de 60 utilizando embriões de pinto (Konigsberg, 1963; revisado em Yaffe, 1973). Células musculares esqueléticas (CME) são cultivadas de uma grande variedade de espécies de insetos, aves e de mamíferos. Culturas primárias de

tecidos embrionários são obtidas por dissociações mecânicas, enzimáticas ou pela conjugação de ambas as técnicas (Konigsberg e cols., 1978) e cultivadas em meio suplementado com soro (soro de cavalo, fetal bovino, extrato embrionário). Esses agentes são indutores da atividade mitótica, facilitam a adesão celular às superfícies e são estimuladores da fusão de membranas (De Haan, 1965; De Lucca, 1966). A adição de cálcio no meio de cultura é fundamental para o início do processo de fusão celular (Shainberg e cols., 1969).

Durante a dissociação enzimática do tecido muscular, são isolados pelo menos três tipos celulares mononucleados: fibroblastos, mioblastos e miofibroblastos. Algumas manobras são utilizadas ao longo do cultivo objetivando enriquecer a população de mioblastos e diminuir a de fibroblastos. A sequência de eventos morfofuncionais característicos da miogênese esquelética é: mioblastos, mioblastos competentes para fusão (miócitos), miotubos jovens, miotubos maduros e miofibras (revisto em Inestrosa, 1982). O músculo diferenciado é caracterizado pela presença de células multinucleadas não divisíveis (miotubos e miofibras) formadas pela fusão dos miócitos. O processo de fusão é dependente da composição do meio e da densidade celular (Linkhart e cols., 1981).

Linhagens celulares de mioblastos têm sido obtidas a partir de tecido muscular esquelético de rato (L6 e L8) e camundongo (C12). Esses mioblastos, após um período de multiplicação *in vitro* requerem uma mudança de concentração de soro em seu meio e para que ocorra o disparo da diferenciação miogênica e consequente formação de miotubos (Yaffe, 1968; Yaffe e Saxel, 1977).

A escolha do modelo de células musculares esqueléticas (CME), proposto por nosso grupo durante o estudo da interação do *T. gondii*-célula hospedeira e que está sendo utilizado na presente dissertação, baseia-se em dados iniciais *in vivo*, os quais demonstraram que a cistogênese é prevalente nos tecidos neurais e musculares, tanto cardíaco quanto esquelético (Jacobs, 1967; Mehlhorn e Frenkel, 1980; Dubey, 1988; Frenkel, 1990). Além disso, esta escolha se justifica: (i) pela importância das CME como uma das células alvo, onde o parasito se aloja durante a fase crônica da doença (Remington e Cavanaugh, 1965), (ii) pelos relatos de toxoplasmose muscular esquelética em pacientes com HIV (Gherardi e cols., 1992); (iii) pelos nossos recentes resultados, demonstrando a ocorrência de cistogênese

espontânea na célula muscular esquelética (Guimarães e cols., 2003; Guimarães e cols., 2008; revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a, b), (v) pelo músculo infectado representar uma das principais vias de transmissão da infecção nos humanos, durante a ingestão de carne crua ou mal cozida.

1.6 Fosfatidilserina

1.6.1 Identificação, biossíntese, degradação e distribuição celular

Fosfatidilserina (PS), um glicerofosfolípido, é um importante constituinte das membranas das células eucariotas. Sua estrutura foi elucidada por Folch em 1941 e subsequentemente confirmada por síntese química (Baer e Maurukas, 1955). É um fosfolípido ácido (aniônico) com três grupos ionizáveis: a porção fosfato, o grupo amino e o grupo carboxi (Fig. 1.4). A porção fosfato polar está na posição sn-3 da estrutura do glicerol, assim a molécula de serina ligada ao fosfato confere a PS carga negativa sob condições fisiológicas, diferente dos lipídios mais abundantes, como fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) (Kay e Grinstein, 2013).

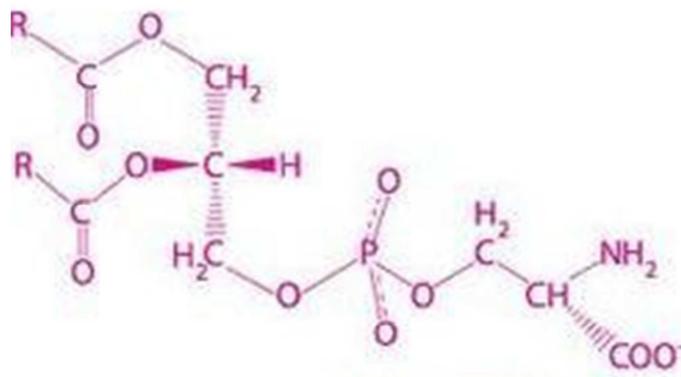


Fig. 1.4 Estrutura molecular da fosfatidilserina. Retirado da Internet em 08/02/2004. Fonte: <http://trade.indiamart.com/details.mp?offer=1981492088>

Em células de mamíferos, a síntese de PS pode ocorrer por duas vias enzimáticas: a primeira onde a PS sintase 1 (PSS1) troca a colina da PC por uma serina, e a segunda onde a enzima sintase 2 (PSS2) pode trocar etanolamina da PE pela serina. Essas duas vias de síntese são parcialmente redundantes, pois experimentos como camundongos sem PSS1 ou PSS2 sobrevivem, enquanto os

duplo nocaute para PSS1 e PSS2 é letal, indicando que o PS é um fosfolípido essencial para sobrevivência de mamíferos (Bergo e cols., 2002; Arikkeeth e cols., 2008).

A distribuição intracelular da PS não é homogênea e a sua maior concentração na célula está na membrana plasmática, representando cerca de 12% do total dos fosfolípidios. Um aspecto importante da PS é a sua tendência de ser distribuída de forma assimétrica entre os folhetos das membranas. Especialmente evidente no plasmalema, onde praticamente toda a PS está no folheto interno em células saudáveis (Boon e Smith, 2002; Fairn e cols., 2011; Kay e cols., 2012).

O retículo endoplasmático (RE) é o principal local de síntese de lipídios, e em mamíferos tanto PSS1 e PSS2 são localizadas e ativas em áreas especializadas do RE, que são conhecidas como membranas associadas à mitocôndria (MAM) devido à sua estreita relação e tendência a serem isoladas junto com as mitocôndrias (Vance e Steenbergen, 2005; revisto em Vance e Tasseva, 2013). Apesar de ser produzida no RE, a PS não é particularmente abundante neste compartimento (cerca de 1%), sugerindo que o transporte seletivo ou remoção de PS deva ocorrer. As MAM são enriquecidas em várias atividades de enzimas biossintéticas de lipídios e se tornam de forma reversível, ancoradas às mitocôndrias. Em células de mamíferos, a formação desses locais de contato entre as MAM e mitocôndrias parece ser necessária para eventos celulares chave, incluindo o transporte de cálcio do RE para as mitocôndrias, a importação da fosfatidilserina em mitocôndrias do RE para a descarboxilação da fosfatidiletanolamina, a formação de autofagossomas, a regulação da morfologia, dinâmica e funções das mitocôndrias, e sobrevivência celular. Tendo em vista o envolvimento aparente de MAM em vários processos celulares fundamentais, estudos recentes indicam que o contato deficiente entre MAM e mitocôndrias pode estar por trás da patologia de diversas doenças neurodegenerativas humanas, incluindo a doença de Alzheimer. Além disso, as MAM têm sido implicadas na modulação da homeostase da glicose e na resistência à insulina, bem como em certas infecções virais (Vance, 2013). A degradação de PS se dá principalmente por descarboxilação do grupo principal de PS para produzir PE, uma reação mediada pela enzima descarboxilase PS (PSD) (Leventis e cols, 2010).

1.6.2 Funções biológicas e detecção de células apoptóticas

Além da sua função como um componente de membranas celulares e como um precursor de outros fosfolípidios, a PS é um co-factor essencial que se liga e ativa um grande número de proteínas, especialmente aquelas com atividades de sinalização. A fosfatidilserina no folheto citosólico de endossomas e lisossomas permite que esses compartimentos se liguem a proteínas com domínios de ligação à fosfatidilserina específicos, incluindo vários de vias de sinalização e fusogênica importantes. Além disso, a elevada concentração de sítios aniônicos conferindo acumulação de carga negativa na sua superfície induz à ligação de proteínas poliacatiônicas, cujo efeito é que certas proteínas são re-direcionadas de uma membrana alvo para outra, envolvendo outras enzimas, tais como Na^+/K^+ ATPase e esfingomielinase neutra (Kay e Grinstein, 2013). Fosfatidilserina não está envolvida na sinalização celular por meio da formação de metabolitos, como é o caso do fosfatidilinositol (Vance, 2008).

Fosfatidilserina é conhecida por ter um papel importante na regulação da apoptose (morte celular programada) em resposta a certos estímulos dependentes de cálcio. A distribuição normal do lípido no folheto interno da bicamada é então interrompida, devido à estimulação de enzimas, tais como *flippases* ou *scramblase*, que podem mover fosfatidilserina (*flip-flop*) em ambos os sentidos através da membrana, e a inibição de translocases aminofosfolípido, que devolve o lípido para o lado interior da membrana (Figura 1.5). Após transferência para o folheto exterior da célula, acredita-se que um receptor na superfície de macrófagos e células relacionadas com a limpeza reconheça a fosfatidilserina e facilite a remoção das células apoptóticas e os seus conteúdos potencialmente tóxicos ou imunogênicos de uma forma não inflamatória. Este processo é essencial para o desenvolvimento do pulmão e do cérebro, e também relevante para situações clínicas em que a apoptose desempenha um papel importante, tais como o câncer, a auto-imunidade crônica e infecções (Buckland e Wilton, 2000; Chaurio e cols., 2009).

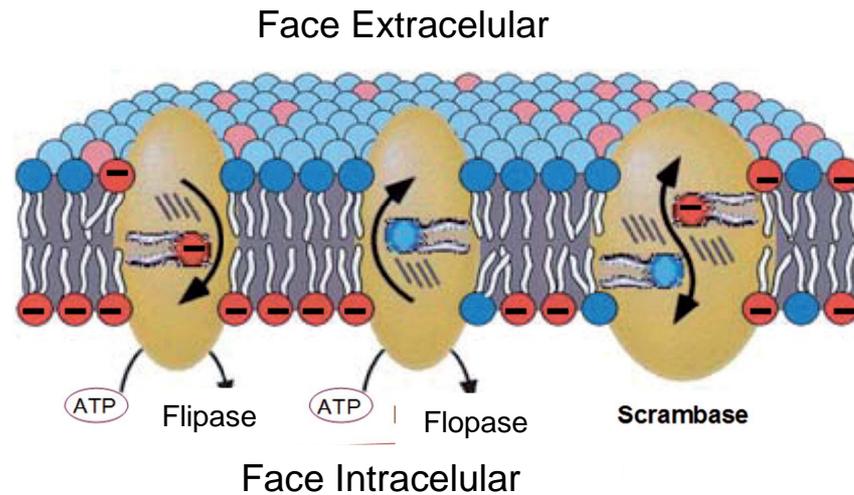


Fig. 1.5. Mudanças controladas por transportadores de fosfolípidios entre os folhetos intracelular e extracelular da membrana celular criando forte assimetria de carga. Reproduzido com modificações de Zwaal e cols. (2005) e Demchenko (2012).

O processo de apoptose é muitas vezes acompanhado pela geração de espécies reativas de oxigênio, que provocam a oxidação rápida de ácidos graxos em fosfatidilserina, antes deste lipídio ser exteriorizado. Além disso, quantidades de fosfatidilserina circulam por um mecanismo semelhante ao da superfície de linfócitos T que expressam baixos níveis da enzima transmembranar tirosina fosfatase. Esta mudança na distribuição atua então, como um mecanismo de sinalização para modular as atividades de várias proteínas da membrana (Chaurio e cols., 2009).

A proteína anexina V liga-se com elevada especificidade à fosfatidilserina e é utilizada como uma sonda para detectar células apoptóticas (Koopman e cols., 1994). A anexina V funciona bem para a detecção de PS presente no folheto exofacial da membrana plasmática, no entanto, a utilidade para a visualização de PS intracelular em células vivas é limitado, devido à sua exigência de elevadas concentrações de cálcio (Andree e cols., 1990; Fadok e cols., 2000; revisto em Demchenko, 2012).

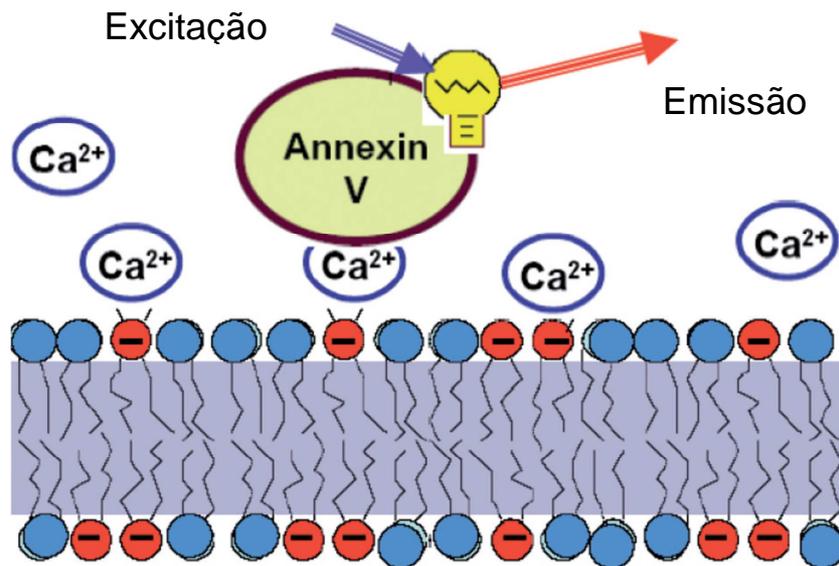


Fig. 1.6. O princípio do método de detecção de apoptose com anexina V. Com o auxílio de íons Ca^{2+} , a proteína interage com alta afinidade com cabeças de PS expostas na superfície da membrana. A anexina V pode ser marcada com corante fluorescente que permite visualizar sua marcação em células com PS exposto. Reproduzido com modificações de Demchenko (2012)

1.6.3 Fosfatidilserina em patógenos e interação com células hospedeiras

Os lipídios não são apenas usados pelos patógenos como fonte de nutrientes, mas também são fatores importantes para a patogênese, pois permitem que o patógeno silencie respostas imunes, manipule processos de invasão e cause a doença. Em muitos casos, estes lípidos são sintetizados pelo patógeno (Ehrt e Schnappinger, 2007).

Por meio da exposição da fosfatidilserina, as células apoptóticas são internalizadas de forma eficiente por fagócitos, prevenindo uma resposta inflamatória. Assim, através da evolução, bactérias e alguns parasitos, tais como formas amastigotas e promastigotas metacíclicos de *Leishmania amazonensis* e promastigostas de *Trypanosoma cruzi*, passaram a utilizar o processo chamado de “mimetismo apoptótico” para a evasão do sistema imune do hospedeiro, que é necessário para a infecção de novas células de mamíferos (Wanderley e Barcinski, 2010).

Quando há o reconhecimento da fosfatidilserina pelos macrófagos, via receptor de fosfatidilserina (PSR), ocorre a secreção de $\text{TGF-}\beta$ e síntese de IL-10 é induzida, enquanto a produção de óxido nítrico é inibida (Balanco e cols., 2001).

Um modelo bem estudado é *Leishmania amazonensis*, onde formas amastigotas purificadas de lesões de camundongos expõem PS na superfície, mas permanecem viáveis, sem perder a infectividade. Essas formas são capazes de se replicar em macrófagos após a infecção, sugerindo que não estão morrendo por apoptose. No entanto, assim como ocorre durante o reconhecimento de células apoptóticas, o fenótipo anti-inflamatório é induzido (Balanco e cols., 2001).

A internalização de amastigotas que expõem PS ocorre por processo de macropinocitose, assim como é observado em células apoptóticas. A quantidade de PS exposta na superfície das amastigotas é diretamente proporcional a ativação da macropinocitose, a indução da produção de TGF- β e IL-10 e a inibição da síntese de NO. A reversão destes processos foi observada pelo bloqueio do reconhecimento de PS pela incubação com Anexina V (Wanderley e cols., 2006).

Ainda em *Leishmania* foi observada variação na exposição de PS na superfície das amastigotas, de acordo com o perfil genético do camundongo infectado. Quando os parasitos são isolados de lesões de camundongos BALB/c (suscetíveis à leishmaniose), as amastigotas expõem mais PS do que quando isoladas de camundongos C57BL/6 (resistentes à doença). A quantidade de PS exposta na superfície do parasito é diretamente relacionada com sua infectividade (Wanderley e cols., 2006). Experimentos com diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* apontaram que apenas as formas infectivas deste parasito, as tripomastigotas, expõem PS na sua superfície. O reconhecimento da PS em tripomastigotas por macrófagos, também se mostrou relacionado à inibição da produção de NO (DaMatta e cols., 2006).

1.6.4 Comportamento de subpopulações PS⁺ e PS⁻ em *T. gondii*

Em experimentos com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, purificados do peritônio de camundongos, foi observada a exposição da PS na superfície de aproximadamente 50% dos parasitos. A exposição de PS nesse modelo mostrou a existência de um fator de virulência importante durante a infecção, que resulta em mecanismos de evasão da ativação macrofágica, com inibição da produção de NO e aumento da produção de TGF- β pelos macrófagos (Seabra e cols., 2004).

Dos Santos e colaboradores em 2011 isolaram subpopulações de taquizoítos da cepa RH e analisaram os mecanismos de entrada, permanência e inibição de NO em macrófagos murinos, além da patologia e sobrevivência em camundongos suíços. Assim, observou-se que o índice de infecção em macrófagos foi semelhante para ambas subpopulações, porém, menor quando comparado com a população total de parasitos. O índice de crescimento em macrófagos foi maior na população total, intermediário em PS⁺ e menor em PS⁻. Quanto à produção de NO, a subpopulação PS⁺ e a população total conseguiram inibi-la, enquanto a PS⁻ não foi capaz de impedir o desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Notou-se também que os PS⁺ foram capazes de invadir os macrófagos por penetração ativa, demonstrado pelo tamanho apertado do vacúolo parasitóforo, enquanto os PS⁻ entravam por fagocitose, fato sugerido pelo aparecimento de um vacúolo mais largo.

Os ensaios *in vivo* realizados pelo mesmo grupo demonstraram que camundongos infectados com a subpopulação PS⁻ apresentaram sinais claros de inflamação e conseqüentemente uma morte mais rápida do que camundongos infectados pela população total. Apesar da subpopulação PS⁺ não apresentar sinal de inflamação em animais, foi verificada uma carga parasitária intensa, sugerindo assim, que é importante que as duas subpopulações estejam juntas para haver o sucesso de infecção, sem que ocorra a morte do hospedeiro.

Aliando o ineditismo do emprego de células musculares esqueléticas, como modelo do estudo da toxoplasmose experimental, com a avaliação da interação de subpopulações de *T. gondii* (positiva e negativa para exposição de fosfatidilserina) o desafio é empregar formas bradizoítas e taquizoítas de uma cepa tipo II, avirulenta, nesta infecção. A proposta é elucidar se a exposição de fosfatidilserina influencia na interação do parasito em CME e no desenvolvimento da cistogênese, *in vitro*.

1.7 Justificativa

Com base nestes dados, nosso interesse foi estender esses estudos, avaliando subpopulações da cepa avirulenta de *T. gondii* ME-49, com destaque para as formas bradizoítas, a forma infectante natural da toxoplasmose, através do consumo de carne crua ou mal passada e como modelo celular a célula muscular esquelética, onde ocorre espontaneamente a cistogênese de *T. gondii* (Guimarães e cols., 2008, 2009, Ferreira-da-Silva e cols., 2008). O emprego do músculo esquelético como

modelo de estudo da toxoplasmose, permite o entendimento da biologia do parasito na fase crônica da doença; e com potencial para fornecer subsídios que possam intervir nesta via de disseminação da doença, pela ingestão de carne contaminada.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar a interação de subpopulações de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* (positiva e negativa para fosfatidilserina) da cepa ME-49 células musculares esqueléticas e C2C12

2.2. Objetivos específicos

1. Analisar a exposição de PS em cistos, taquizoítos e bradizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*;
2. Analisar o processo de adesão e invasão de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* em cultura primária de células musculares esqueléticas e em C2C12 infectadas com sub-populações (positiva e negativa para fosfatidilserina);
3. Analisar o destino intracelular dessas sub-populações de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* em células musculares esqueléticas, visando monitorar a cistogênese, *in vitro*.

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 por meio da licença CEUA LW 10-10 e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos. Os animais foram cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz

3.1. Manutenção e diferenciação de linhagem de mioblasto de camundongo (C2C12).

A linhagem C2C12 utilizada neste trabalho foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) e trata-se de um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de músculo esquelético de camundongo da linhagem C3H. Estas células foram cultivadas no meio DMEM- F12 (“Dulbecco's Modified Eagle Medium”) (Cultilab,) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibiótico, contendo penicilina G, sulfato de estreptomicina e anfotericina B (Sigma Aldrich) e mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera contendo 5% de CO₂. A partir do monitoramento do crescimento e quando a monocamada celular atingiu a confluência de 80%, foi feito o subcultivo com lavagem em tampão fosfato (PBS) (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; pH 7.4) e em solução de dissociação contendo 0,05% tripsina e 0,01% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), diluído em PBS, pH 7.0. A solução contendo as células isoladas foi centrifugada a 1000 rpm e posteriormente as células foram ressuspensas em meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital, Azul de Trypan a 0,4% em PBS. Células com viabilidade maior que 95% foram utilizadas nos experimentos. Após o plaqueamento dos mioblastos em placas de 24 poços (0,05 x 10⁶ células/poço) ou em garrafas de 25 cm³ (1 x 10⁶ células/garrafa) eles foram mantidos em meio de cultivo DMEM - F12 suplementado com 10% bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Sigma Aldrich). Para o estabelecimento da miogênese, o meio de cultivo foi trocado por DMEM-F12 suplementado com 1% SFB.

3.2. Cultura primária de células do músculo esquelético

Culturas primárias de células do músculo esquelético (CME) foram obtidas a partir de músculos da coxa de fetos de camundongos albinos Swiss-Webster de 18-21 dias de idade. As fêmeas foram eutanasiadas em câmara mortuária contendo dióxido de carbono (CO₂), seguido do deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta, com auxílio de material cirúrgico estéril e o útero foi removido. Os fetos foram separados de suas placentas e transferidos para placa de Petri contendo solução de Ringer (154 mM NaCl, 56 mM KCl, 17 mM Na₂HPO₄ em solução aquosa), pH 7.0. Os fetos ainda sob o efeito do CO₂ foram decapitados, suas coxas retiradas dos membros posteriores e mantidas em solução de Ringer no gelo. O tecido muscular foi isolado dissecando-se as coxas com a retirada da pele e dos tecidos ósseo e cartilaginoso, sendo fragmentado em lâmina escavada utilizando bisturi. Os fragmentos foram lavados por 5 min com solução de Ringer, para remoção das hemácias sobre uma placa agitadora aquecida a 37°C, seguida da lavagem por duas vezes em PBS. Os tecidos foram incubados por 7 min com tripsina 0,05% e 0,01% de EDTA diluídos em tampão fosfato, pH 7.2 (PBS). Após cada ciclo de dissociação, a digestão enzimática era interrompida pela transferência das células em suspensão para tubos de 15 mL contendo 2 mL de meio DMEM F12, com adição de 10% de SFB a 4°C. A morfologia, a viabilidade e o número de células foram monitorados por microscopia de contraste de fase, após cada etapa de dissociação. A amostra foi centrifugada a 1000 rpm por 7 min, ressuspensa em meio DMEM suplementado com 10% soro de cavalo, 5% SFB, 2% extrato de embrião de pinto e 1% solução de antibiótico (Sigma Aldrich). Em seguida, para obtenção de culturas ricas em mioblastos, as células foram incubadas por 30 min a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, numa superfície previamente revestida com 0,02% de gelatina, com o objetivo de se obter a adesão inicial de fibroblastos. Após esta pré-incubação, o sobrenadante contendo as células não aderentes (mioblastos) foram centrifugadas a 1000 rpm por 7 min. Após a centrifugação, o sedimento enriquecido com mioblastos, foi quantificado em câmara de Neubauer e as células semeadas em superfícies revestidas com 0,02% de gelatina (placas de cultura de 24 poços, ou em placas de Petri de 60 mm). As culturas foram mantidas a 37°C por 2-5 dias para obter as fibras musculares e o meio de cultivo foi renovado a cada dois dias (Barbosa e cols., 2000).

3.3. Obtenção de cistos teciduais de *T. gondii*

Camundongos da linhagem C57BL/6 pesando 12-18 gramas foram infectados com cerca de 50 cistos teciduais da cepa ME49 (cepa cedida pelo Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil). Após 6 a 12 semanas do inóculo, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, seguido do deslocamento cervical, e os cérebros coletados por método cirúrgico e lavados três vezes em PBS para remoção de hemácias. Os cérebros então foram fragmentados com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e em seguida, macerados em PBS por meio de sucessivas passagens dos fragmentos em agulhas de diferentes calibres (18-23 G). A seguir, 20 µl da suspensão total contendo cistos foram colocados entre lâmina e lamínula (24 x 32 mm) e o número total de cistos foi determinado em toda área da lamínula no microscópio de luz, utilizando-se ocular e objetiva de 10X. Após a quantificação novos animais eram infectados para a manutenção da cepa em camundongos ou os cistos foram utilizados para os ensaios experimentais, *in vitro*.

Visando a purificação dos cistos isolados do cérebro para posterior obtenção de bradizoítos (método descrito no item 3.5), após a maceração dos fragmentos, a suspensão tecidual (contendo os cistos) foi filtrada utilizando-se uma peneira de aço inox com malha de 60 "mesh" ("cell dissociation sieve-tissue grinder kit", Sigma Aldrich) para remoção de pequenos fragmentos de tecido e de debris celulares. Após este procedimento, a suspensão já semi purificada foi ressuspensa em PBS e centrifugada a 400 g durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspensa em meio DMEM F12 com 25% de Dextran, a uma concentração de cerca de um cérebro por 2,5 mL de solução final. Após centrifugação a 2200 g por 10 min, a fração localizada no fundo do tubo contendo os cistos, foi recuperada e as demais frações, principalmente a superior, contendo debris celulares foram descartadas.

3.4. Obtenção de bradizoítos de *T. gondii*

Cisto purificados foram adicionados à uma solução aquosa de pepsina ácida contendo 0,052% de pepsina, 1,4% de ácido clorídrico e 1% de cloreto de sódio

diluída na proporção pepsina ácida:cistos de 1:5 (v/v) por 30 min a 37°C, sob agitação. A seguir, a atividade enzimática foi neutralizada em uma solução final de 0,1% carbonato de sódio em PBS. Imediatamente após a neutralização, adicionou-se meio DEMEM F12 as amostras que foram centrifugadas a 250 g por 10 min e ressuspensas no mesmo meio. Uma alíquota da suspensão de parasitos foi colocada em câmara de Neubauer para determinação do número de parasitos isolados. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com Azul de Trypan. Após a quantificação, os parasitos foram imediatamente usados nos experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira.

3.5. Obtenção de taquizoítos de *T. gondii*.

Taquizoítos da cepa ME49 do *T. gondii* foram mantidos por meio de passagens em culturas celulares de célula epitelial (células Vero, isoladas a partir do rim de um macaco verde Africano adulto normal e células B16-F10, isolada a partir de melanoma espontâneo de camundongos *Mus musculus*, C57BL/6J) e coletados com o rompimento das células por meio de sucessivas passagens com agulhas de 18-23 G de calibre, em meio de cultura DMEM F12, pH 7.2, após 6 a 9 dias pós-infecção. A suspensão de parasitos obtida foi centrifugada a 250 g por 7 min a temperatura ambiente para remover as células e *debris* celulares e o sobrenadante, que contendo os parasitos, foi coletado e centrifugado a 400 g por 10 min. O *pellet* obtido foi lavado 2 ou 3 vezes com solução salina, pH 7.2 e ressuspensão em solução tampão de cálcio, quantificados em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com Azul de Trypan.

3.6. Análise por citometria de fluxo da exposição de PS por taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii*.

Bradizoítos, taquizoítos e cistos de *T. gondii* foram lavados com tampão de ligação de anexina-V (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7.2) e incubados com anexina-V conjugada a FITC (0.1, 1 e 4 Rg ml⁻¹) e iodeto de propidium (10 Rg ml⁻¹) no mesmo tampão por 20 min a temperatura ambiente. Os controles foram feitos com parasitos mortos por calor ou pela incubação dos

parasitos em tampão de anexina sem Ca^{2+} acrescido de 5 mM de EGTA. Após incubação, os parasitos foram analisados no citômetro de fluxo BD Xcalibur da Universidade Estadual da Zona Oeste, ou Citômetro de fluxo FACScan - BD Biosciences da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz. As análises em histograma e gráfico de pontos foram realizadas no programa WinMDI 2.8 para PC.

3.7. Isolamento das subpopulações de *T. gondii*.

Após coleta e purificação dos parasitos, cerca de 1×10^8 taquizoítos ou 6×10^7 bradizoítos mantidos em suspensão em tampão de ligação de anexina V, foram incubados com Anexina V conjugada a microesferas magnéticas, a temperatura ambiente sobre agitação. Após 60 min, a suspensão de células foi adicionada à coluna magnética e permaneceram aderidos à coluna, somente os parasitos PS positivos. Os parasitos PS negativos foram eluídos da coluna e coletados. A remoção dos parasitos PS positivos da coluna foi feita de acordo com as instruções do fabricante Miltenyi Biotec. Três experimentos independentes foram realizados em cada uma das condições mencionadas e os resultados submetidos à análise estatística com nível de significância de 0,5% ($p \leq 0,05$ - ANOVA/Tukey).

3.8. Interação de bradizoítos de *T. gondii* e células musculares

As culturas da linhagem C2C12 foram semeadas em garrafas de 25 cm^3 com cerca de 1×10^6 células por garrafa. Após 24 horas as células foram infectadas com subpopulações de bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 PS positivos, PS negativos e população total, isolados como descrito no item 3.7. Os ensaios de interação foram realizados na proporção de 1:10 (parasito-célula hospedeira) durante períodos que variaram de 1 h até 16 dias. Um dia antes da infecção, as culturas infectadas foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 24 poços na proporção $0,1 \times 10^6$ células por poço. Após lavagem em PBS, as lamínulas com culturas infectadas foram fixadas em solução de Bouin ou 4% PFA e coradas para análise por microscopia de luz, como descrito no item 3.10 e fluorescência, como descrito no item 3.11. A quantificação do percentual de infecção, índice de infecção (percentual de células

infectadas x média de parasitos por célula foram realizados nas diferentes culturas em microscópio de campo claro, a partir da contagem mínima de 300 células/lamínula em duplicata e o percentual de vacúolos DBA positivos e número absoluto de cistos foram quantificados por microscópio de fluorescência. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio Padrão (DP), sendo a análise estatística feita por meio da comparação entre os grupos, utilizando-se a análise de variância ANOVA. O teste de Tukey foi empregado para determinar as diferenças significativas entre os grupos experimentais. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.9. Interação de taquizoítos de *T. gondii* e células musculares

Culturas primárias de CME foram semeadas em placas de 60 mm com cerca de $0,8 \times 10^6$ células e após 5 dias foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49: PS positivos, PS negativos e população total, isolados como descrito nos itens 3.3 e 3.7. Os ensaios de interação foram realizados na proporção de 1:1 (parasito-célula hospedeira) durante períodos que variaram de 1 h até 12 dias. Após lavagem em PBS, as amostras infectadas foram fixadas em solução de Bouin ou PFA 4% em PBS e coradas pelo Giemsa para análise por microscopia de luz, como descrito no item 3.10 e/ou com marcadores fluorescentes para microscopia de fluorescência, como descrito no item 3.11. Três experimentos independentes foram realizados em cada uma das condições. A quantificação do percentual de infecção e o índice de infecção (percentual de células infectadas x média de parasitos por célula) foram realizados nas diferentes culturas em microscópio de campo claro a partir da contagem mínima de 300 células/lamínula em duplicata. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio Padrão (DP) sendo a análise estatística feita através da comparação entre os grupos, utilizando-se a análise de variância ANOVA, sendo o teste de Tukey empregado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.10 Microscopia de luz

De acordo com os objetivos propostos, as culturas de células foram lavadas em PBS e fixadas em Bouin por 5 min e em seguida lavadas três vezes em etanol 70%. A seguir, as células foram coradas pelo Giemsa na proporção de 3:1 (água destilada/Giemsa) por 15 min, lavadas em água destilada e desidratadas em bateria decrescente de acetona-xilol, obedecendo a seguinte ordem: 100% de acetona, 100% de acetona, 60% de acetona + 40% de xilol, 50% de acetona + 50% de xilol, 60% de xilol + 40% de acetona, 100% de xilol e 100% de xilol. Após a secagem das lamínulas, as lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem Permount e analisadas em microscópio AXO Imager A2 da Zeiss com objetiva de 100X.

3.11. Microscopia de fluorescência

Técnicas de processamento de material biológico para observação de taquizoítos e de cistos por microscopia de fluorescência foram realizadas por meio do emprego de anticorpos monoclonais específicos anti-p30 (TP3 sc-52255 - Santa Cruz), que reconhece especificamente a proteína SAG1 encontrada somente na superfície da membrana plasmática de taquizoítos. Para a identificação de cistos de *T. gondii* foi utilizada a lectina *Dolichos biflorus* (DBA), conjugada com TRITC (Sigma Aldrich) ou FITC (Vector Laboratories), que reconhece resíduos de N-acetilgalactosamina presentes na parede de cistos teciduais de *T. gondii*. Após diferentes períodos de interação, as culturas foram fixadas por 10 min em paraformaldeído a 4% diluído em PBS e lavadas três vezes (10 min cada) com PBS. Para bloquear os radicais aldeídos livres, as células foram incubadas por 30 min em solução de 50 mM cloreto amônia. Após o bloqueio, as células foram permeabilizadas por 30 min em PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% de albumina sérica bovina (BSA-Sigma Aldrich) para bloquear ligações inespecíficas. Para o ensaio de imunofluorescência indireta, as culturas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-p30 diluído 1:100 em PBS contendo 4% de BSA. A seguir, as células foram lavadas em PBS contendo 4% BSA três vezes por 10 min e reincubadas durante 1 h a 37°C com anticorpo secundário (IgG anti-camundongo conjugado com FITC ou TRITC), na diluição de 1:500 em PBS contendo 4% BSA. As culturas foram lavadas três vezes por 10 min em PBS com 4% BSA. A marcação dos

cistos foi feita pela técnica de citoquímica, incubando-se os cistos com a lectina DBA-TRITC ou FITC (1:100) por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as culturas foram lavadas uma vez com PBS contendo 4% BSA e três vezes com PBS e lavar em NaCl 0,9% a temperatura ambiente. Após a lavagem, as culturas foram incubadas por 10 min com um intercalante de DNA, DAPI (4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole, Sigma Chemical Co.) diluído 1:5000 em 0,9% de NaCl, lavadas uma vez com 0,9% NaCl e duas vezes em PBS e montadas em lâmina com ProLong® Gold (Life Technologies). As amostras foram examinadas e fotografadas em microscópio AXIO Imager A2 da Zeiss com objetiva de 100X ou microscópio confocal LSM 710 Zeiss.

4. Resultados

4.1. Detecção de fosfadilserina em parasitos da cepa ME-49 de *T. gondii*

4.1.1 Análise da exposição de PS em cistos por citometria de fluxo e microscopia confocal

Os ensaios da incubação de cistos teciduais, obtidos a partir de cérebro de camundongos C57/BL6, com anexina V-FITIC mostraram que cerca de 92% dos cistos apresentaram marcação positiva para anexina (Fig. 4.1). A viabilidade dos cistos testada com PI indicou baixa permeabilidade da parede cística, pois somente cerca de 2,1% dos cistos apresentam marcação, como visto na Fig. 4.1.

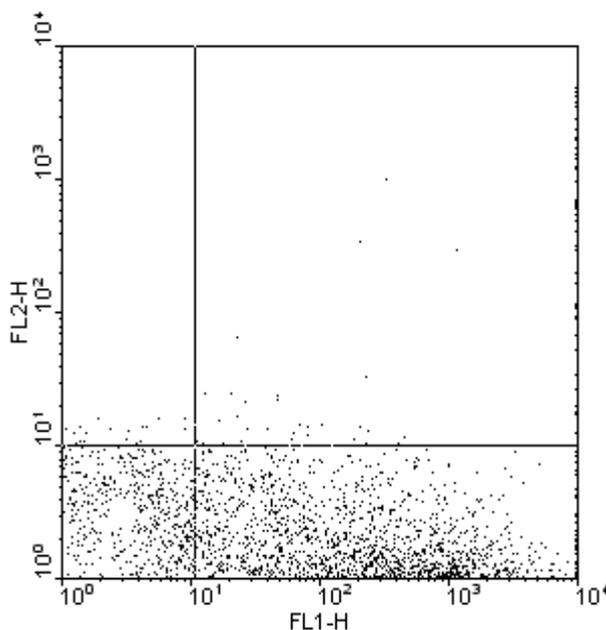


Fig. 4.1. Perfil da exposição de PS em cistos de *T. gondii* da cepa ME49 isolados do cérebro de camundongos após incubação com anexina V-FITIC. Os dados indicam que aproximadamente 92% dos cistos apresentaram PS na sua superfície. O eixo FL2-H representa a marcação com PI e o eixo FL1-H indica a marcação com anexina. Marcação menor que 10^1 não são consideradas significativas.

Microscopia confocal de cistos incubados com anexina e PI a partir de uma série de cortes virtuais de um total de 44 mostrando cortes 22 e 23, regiões correspondentes ao meio dos cistos. Pode ser evidenciada a presença de PS no interior e na superfície dos cistos (Fig. 4.2 A e B). As figuras 4.2 A' e B' são gráficos gerados a partir da intensidade de fluorescência do mesmo cisto. O mesmo cisto visto em maior aumento mostra num único plano focal a marcação por fluorescência

da parede e do interior do cisto (Fig. 4.3 A) e o merge da fluorescência e microscopia interferencial (DIC) (Fig. 4.3 B). As imagens selecionadas correspondem aos cistos cuja permeabilidade da parede cística estava íntegra, portanto, não houve marcação com PI.

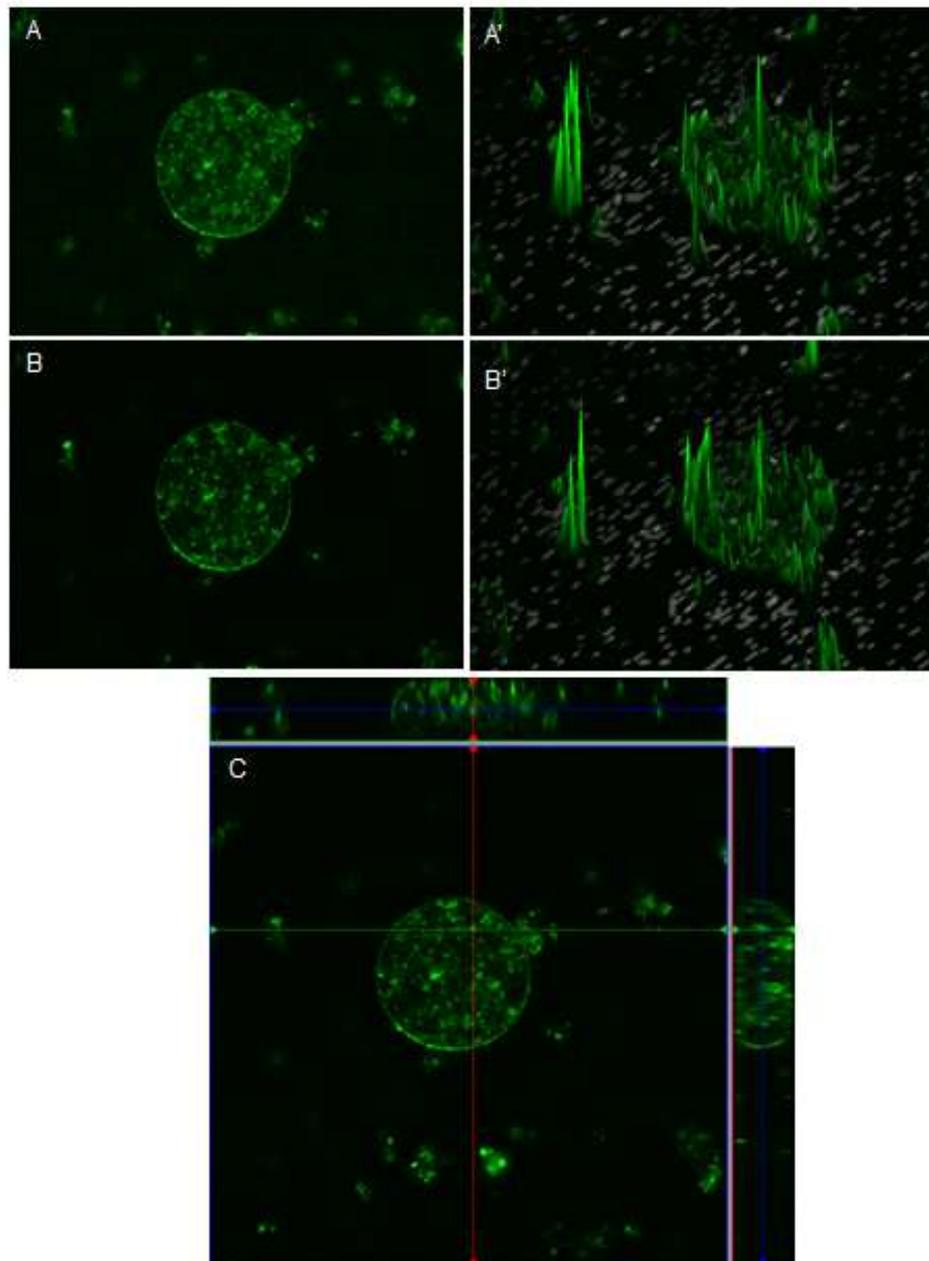


Fig. 4.2. Cistos de *T. gondii* incubados com Anexina V-FITC. A e B: imagens de cortes virtuais de cistos marcados observados por microscopia confocal. A' e B': Ao lado de cada imagem observa-se gráfico de intensidade de fluorescência relativo ao corte. C: Imagem de recurso do programa ZEN®, onde é apresentada a posição de um determinado ponto marcado dentro do cisto, visando reconstrução 3D.

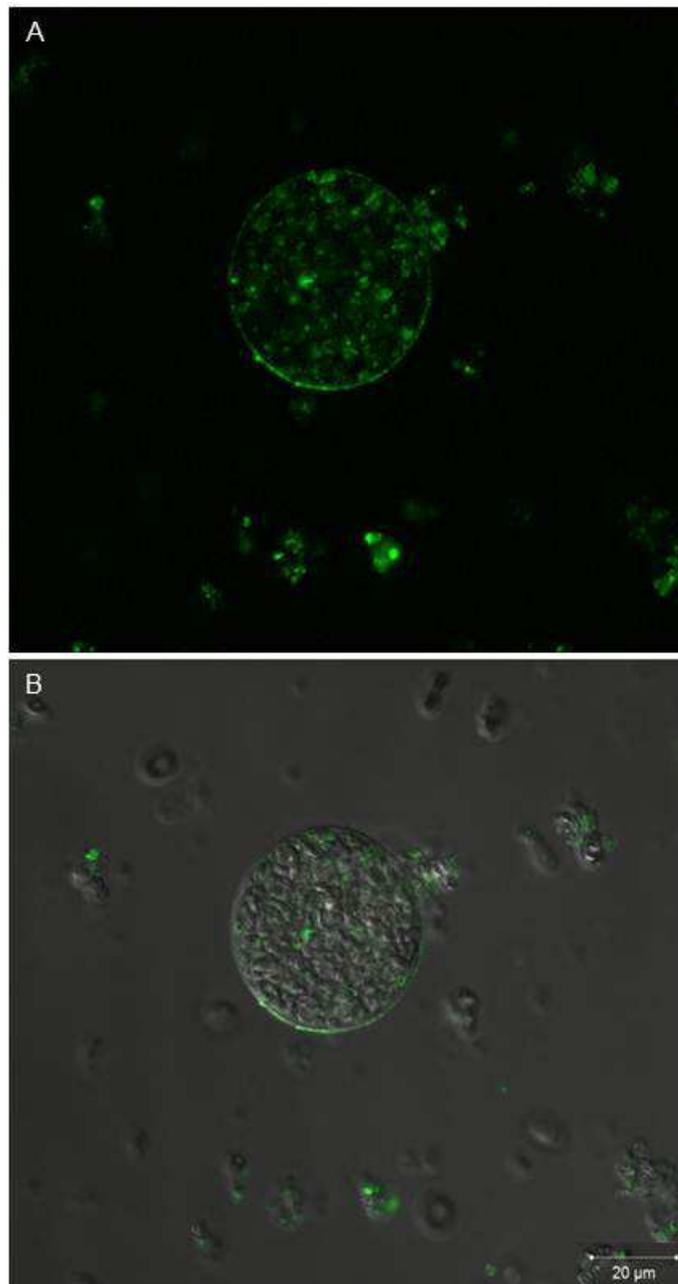


Fig. 4.3 Marcação por fluorescência com anexina V-FITC. A. Marcação da parede e do interior do cisto por fluorescência; B: Merge da fluorescência e microscopia diferencial interferencial (DIC).

4.1.2 Análise da exposição de PS em bradizoítos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência

Bradizoítos obtidos a partir da digestão enzimática da parede cística mostrou por citometria de fluxo que aproximadamente 59,5% destes parasitos apresentaram marcação positiva para anexina V, enquanto aproximadamente 8,6% apresentaram permeabilidade da membrana plasmática como demonstrado pela marcação para PI (Fig. 4.4). A visualização por meio da microscopia de fluorescência dos parasitos incubados com anexina-FITIC mostrou a marcação de parte dos parasitos na sua superfície (Fig. 4.5 A, A' – D-D'). Esses resultados corroboram a análise quantitativa expressa pela citometria de fluxo (Fig. 4.4).

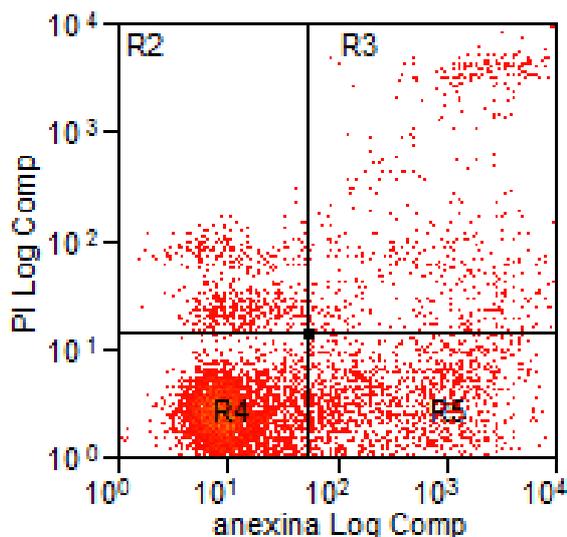


Fig. 4.4. Perfil da exposição de PS em bradizoítos. Observa-se que cerca de 59,5% dos bradizoítos foram marcados com anexina V- FITIC. Em R5 observa-se a marcação de parasitos marcados apenas com anexina e em R2 e R3 representam a marcação com PI. Marcação menor que 10¹ não é considerada significativa (R4).

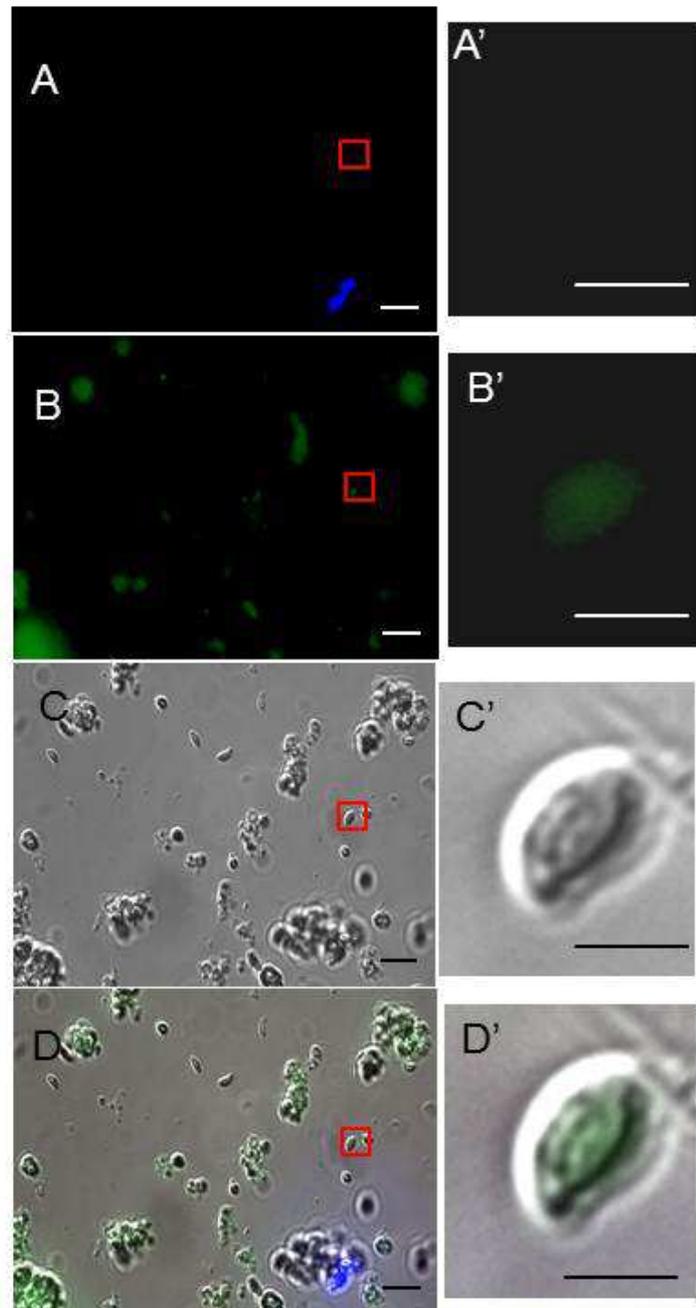


FIG. 4.5. Imagens de fluorescência de bradizoitos marcados com anexina V-FITIC e DAPI. A - núcleos dos parasitos em azul pelo corante DAPI; B - parasitos marcados com anexina em verde; C - Imagem em DIC; D - Merge do DIC + fluorescência. A'-D': detalhe de um parasito em maior aumento. Barras: 10 μ m e 5 μ m.

4.1.3 Análise da exposição de PS em taquizoítos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência

Taquizoítos da cepa ME-49, obtidos do sobrenadante de células Vero, incubados com anexina-FITIC e PI analisados por citometria de fluxo demonstraram que aproximadamente 69,2% destes parasitos tinham PS na sua superfície como detectado pela marcação com anexina, enquanto 1,5% eram positivos para PI (Fig. 4.6). A microscopia de fluorescência mostrou a marcação da superfície dos parasitos (Fig. 4.7 A-D; A'-D').

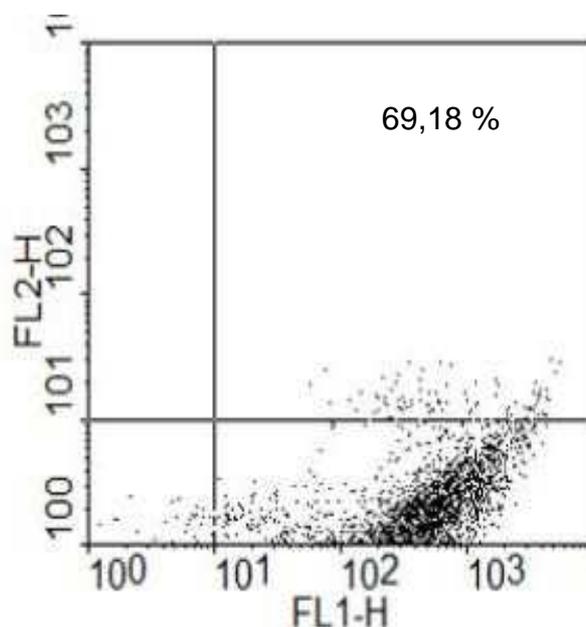


Fig. 4.6. Perfil da exposição de PS de taquizoítos de ME49. Observam-se que cerca de 69,2% dos taquizoítos, obtidos de culturas de células VERO, foram marcados com anexina V-FITIC. FL1-H mostra a análise quantitativa dos parasitos marcados com anexina (PS positivos) e FL2-H representa a marcação com PI. Marcação menor que 10^1 não são consideradas significativas.

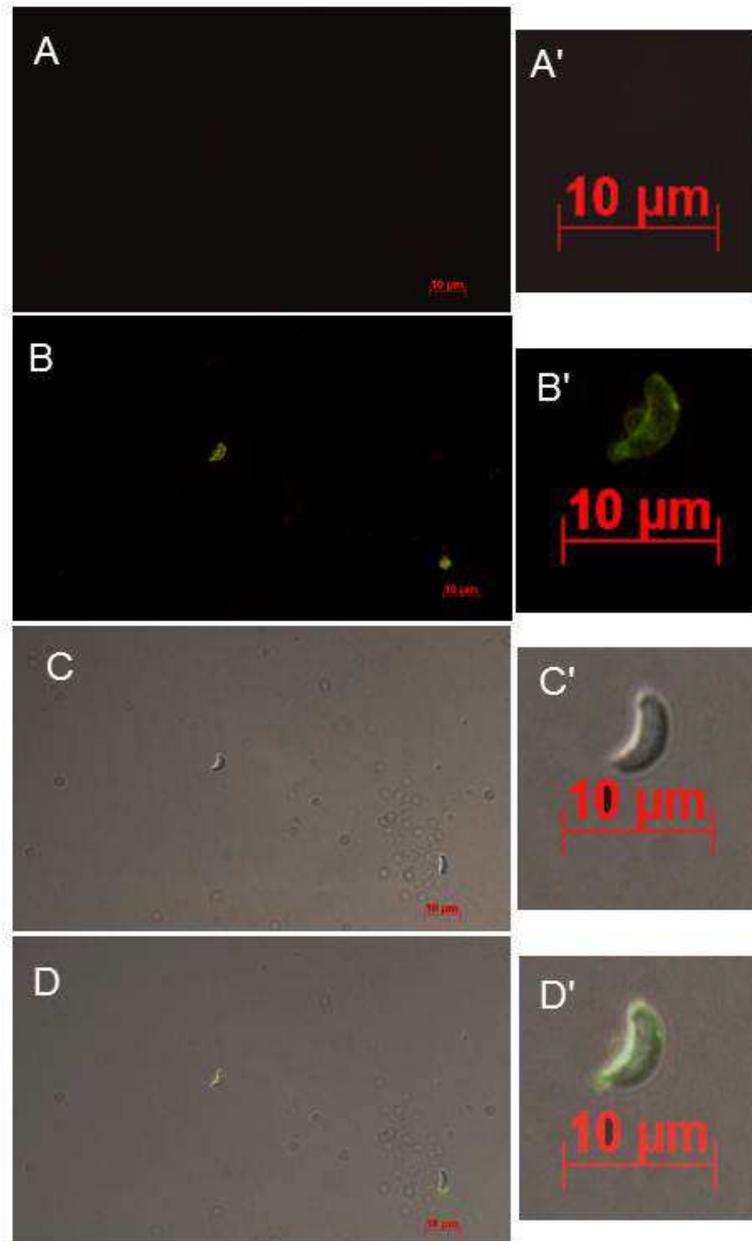


Fig. 4.7. Imagens de fluorescência de taquizoitos de *T. gondii* marcados com anexina V-FITC e PI. A – Negatividade para PI; B - parasitos marcados com anexina em verde; C – Imagem em DIC; D – Merge do DIC + fluorescência. A'-D': detalhe de um parasito em maior aumento. Barras: 10 μ m.

4.2. Cinética de infecção de células musculares esqueléticas com as diferentes subpopulações de bradizoítos e taquizoítos de *T. gondii* PS⁺, PS⁻ e população total.

4.2.1 Análise da infecção de subpopulações PS⁺ e PS⁻ e total de bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 em culturas de linhagem de células musculares esqueléticas (C2C12).

A figura 4.8 mostra o percentual de infecção menor na subpopulação PS⁻ em comparação com a subpopulação PS⁺ e a população total. A diferença entre os índices de infecção da subpopulação positiva e a população total não foi significativa. Em 16 dias, por exemplo, a média do percentual de células infectadas em PS total chegou a aproximadamente 3,8% e as subpopulações PS⁺ a 3,0% e as PS⁻ a 1,7%.

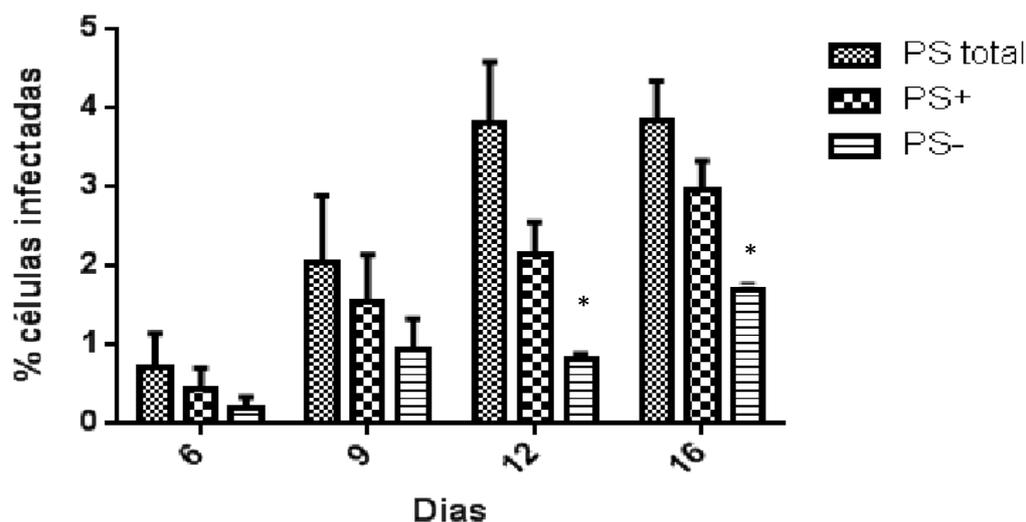


Fig. 4.8. Percentual de infecção com subpopulações de *T. gondii* em C2C12. Infecção com subpopulações de bradizoítos de ME49, obtidos de cérebro de camundongo e isolados em coluna magnética. Observa-se um maior percentual de células infectadas nas populações total e PS positivo em comparação com a população PS negativo.* $p < 0,05$

A análise do índice de infecção reforça os resultados obtidos do percentual de infecção mostrando que a curva de infecção entre os bradizoítos da população total e os positivos é bem próxima, enquanto os PS negativos mostram mais baixa capacidade infectiva (Fig. 4.9). Após 16 dias de interação, o índice de infecção chega aproximadamente a 15,7 na população total, 11 na população PS⁺ e na subpopulação PS⁻ a 5,6.

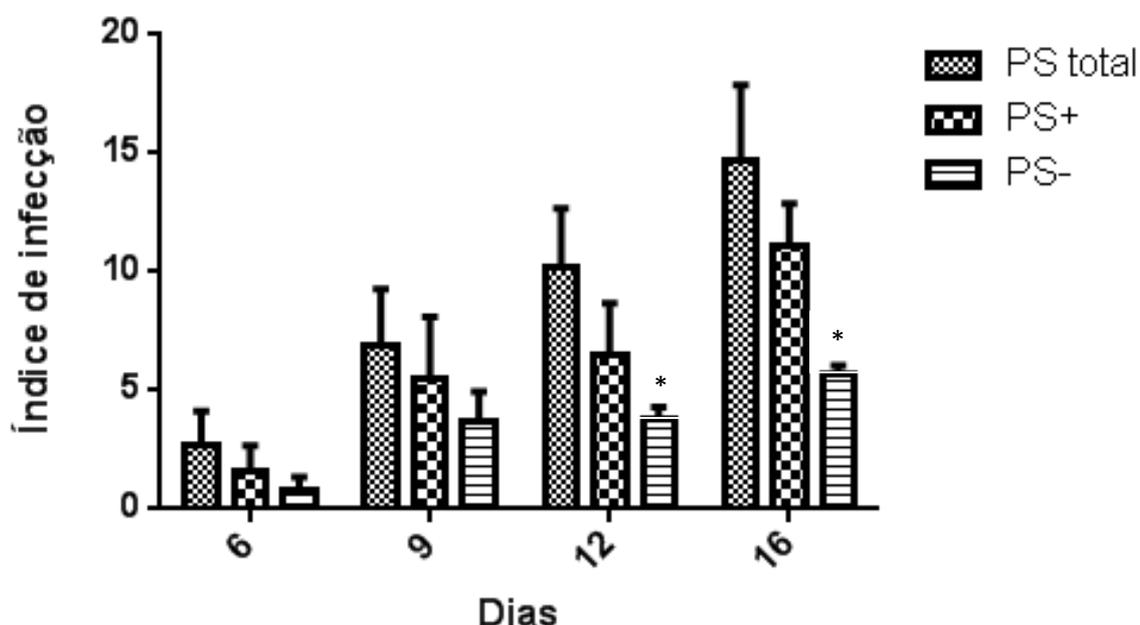


Fig 4.9 Índice de infecção com subpopulações de *T. gondii* em C2C12. Infecção com subpopulações de bradizoítos de ME49, obtidos de cérebro de camundongo e isolados em coluna magnética. Observa-se um maior índice de infecção nas populações total e PS positivo em comparação com a população PS negativo. * $p < 0,05$

Culturas coradas pelo método de Giemsa mostram alguns aspectos desta infecção. A partir de 12 dias de infecção com bradizoítos, pode ser verificada a presença de células contendo vacúolos com pares de parasitos ou em roseta em infecção com população total (Fig. 4.10 A), com PS⁺ mostrando várias células infectadas com 12 dias contendo vacúolos com 2 parasitos cada (Fig. 4.11 A) e com subpopulação PS⁻ após 16 dias de infecção células com número variado de

parasitos por vacúolo (Fig. 4.12 A). Formas intracelulares compartimentalizadas no citoplasma das células, à semelhança da morfologia de cistos foram observadas após 16 dias de infecção, independente da subpopulação de bradizoítos PS⁺ ou PS⁻ ou população total empregada para a infecção primária (Fig. 4.10 C-D; Fig. 4.11 C-D e Fig. 4.12 C-D).

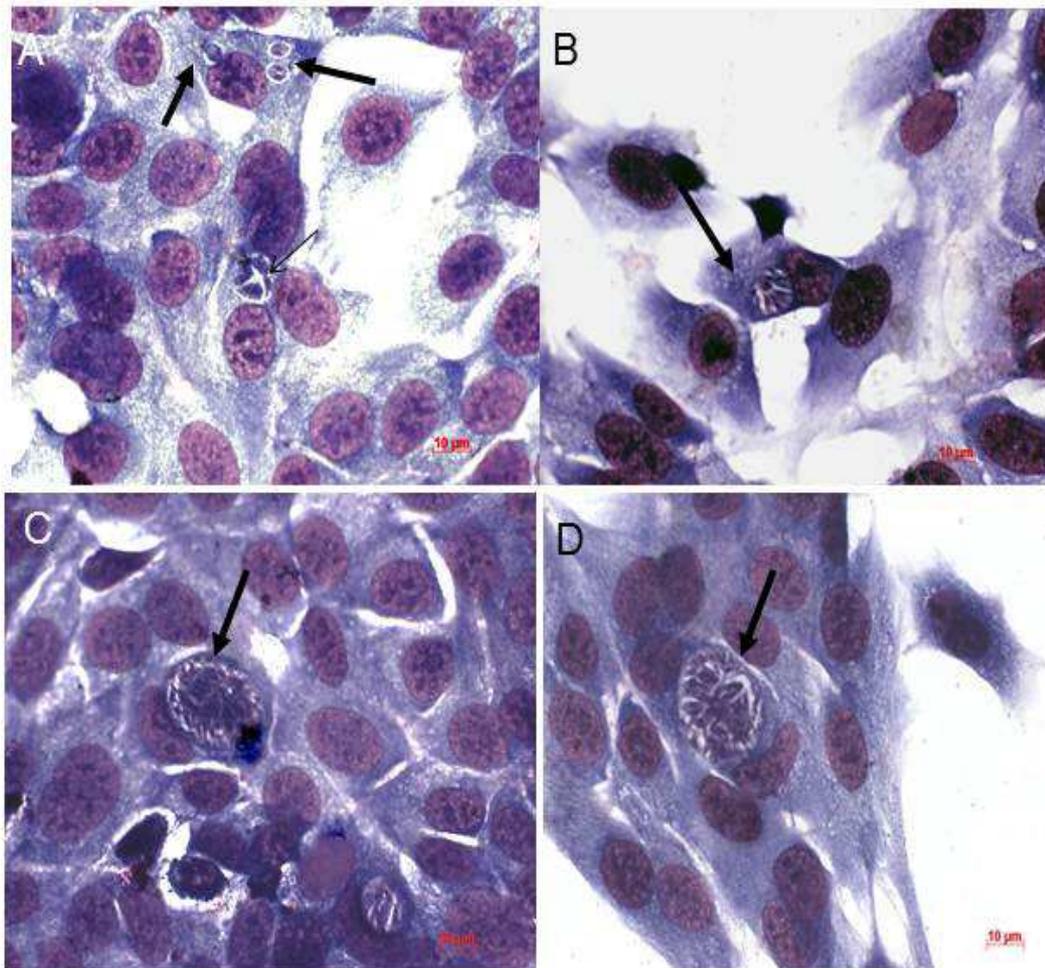


Fig. 4.10 Aspectos de infecção com população total de bradizoítos da cepa ME49 em C2C12 . A: Três vacúolos contendo parasitos em duplas (setas) e uma roseta (seta fina) após 12 dias de infecção; B, C e D: Estruturas semelhantes a cistos teciduais (seta) em diferentes estágios de desenvolvimento com 16 dias de infecção.

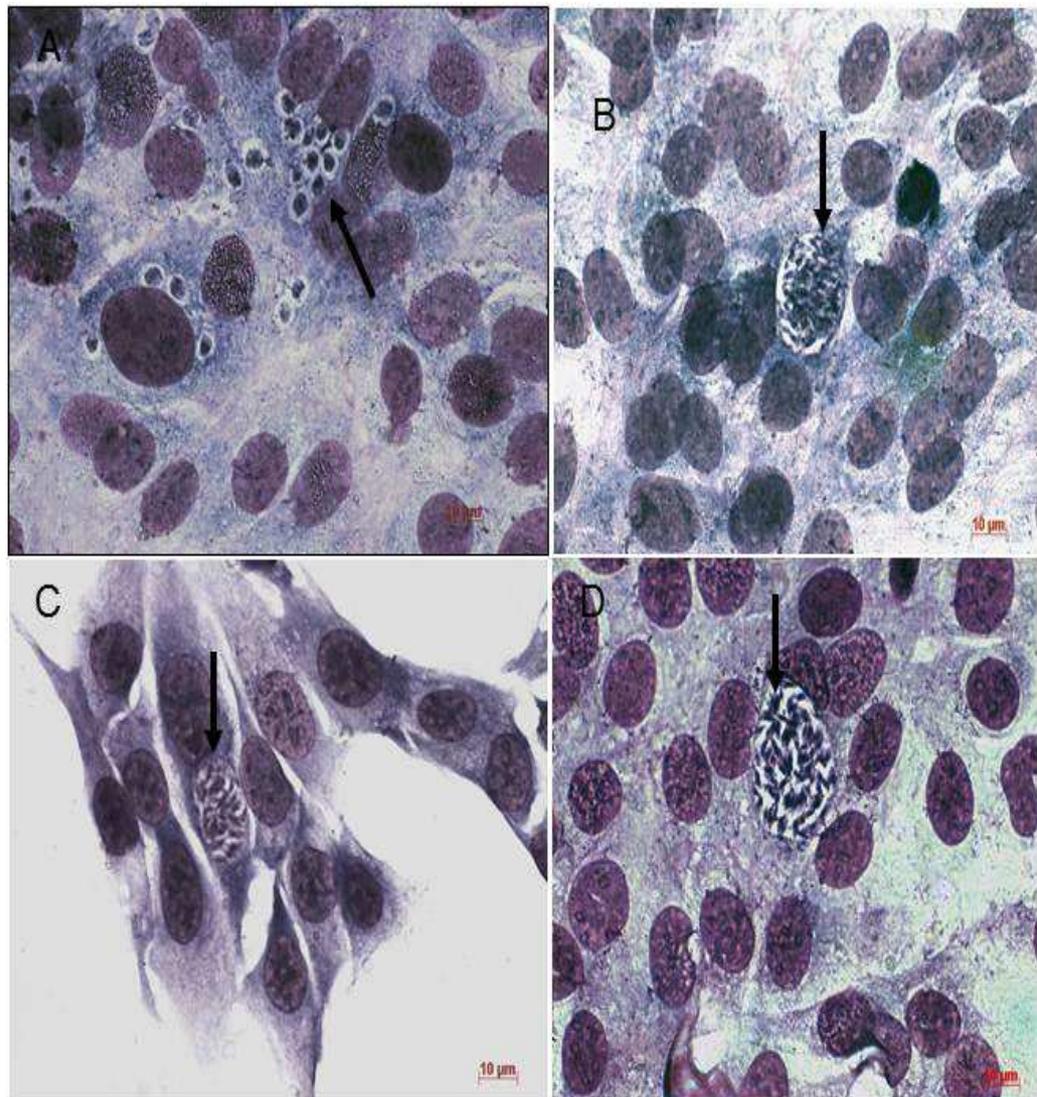


Fig.4.11 Aspectos de infecção com subpopulação PS⁺ de bradizoitos de ME49 em C2C12. A: Células contendo vários vacúolos a maioria com 2 parasitos por vacúolo, após 12 dias de infecção. B: Célula infectada com vacúolo contendo muitos parasitos. C e D: Imagens mostrando formas semelhantes a cistos teciduais (seta) após 16 dias de infecção..

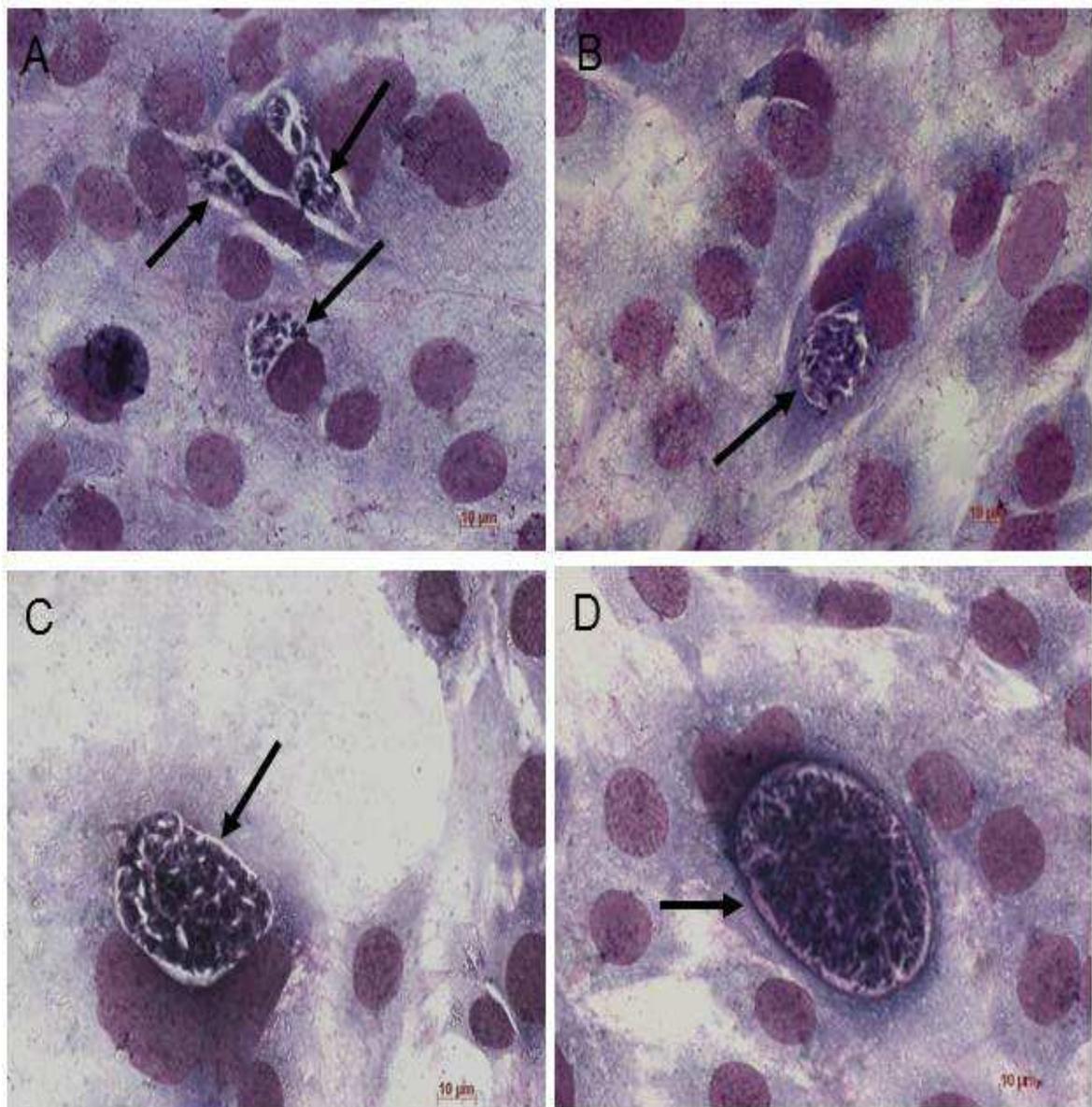


Fig.4.12. Aspectos de infecção com subpopulação PS- de bradizoitos de ME49 em C2C12. A: Células infectadas contendo número variado de parasitos após 12 dias de infecção. B, C e D: Imagens contendo formas semelhantes a cistos teciduais com número elevado de parasitos intracisto (seta) com 16 dias de infecção.

4.2.2 Análise da infecção de subpopulações PS⁺ e PS⁻ de taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 em culturas primárias de células musculares esqueléticas

Culturas primárias de CME foram infectadas com subpopulações de taquizoítos da cepa ME49, obtidos de culturas de células VERO, separados em coluna magnética, e mantidos interagindo por 1 h numa relação de 1:1 (parasito/célula). Após esse tempo, as culturas foram lavadas em solução de Ringer e mantidas interagindo por períodos de 1 h até 12 dias. As culturas foram então, fixadas e coradas em solução de Giemsa ou processadas para microscopia de fluorescência e assim, a capacidade infectiva dessas subpopulações foi quantificada.

A figura 4.13 mostra o percentual de infecção menor na subpopulação PS⁻ em comparação com a subpopulação PS⁺ e total. A diferença entre os índices de infecção da subpopulação negativa em comparação com a população total e positiva é significativa com $p < 0,05$ (Fig. 4.14).

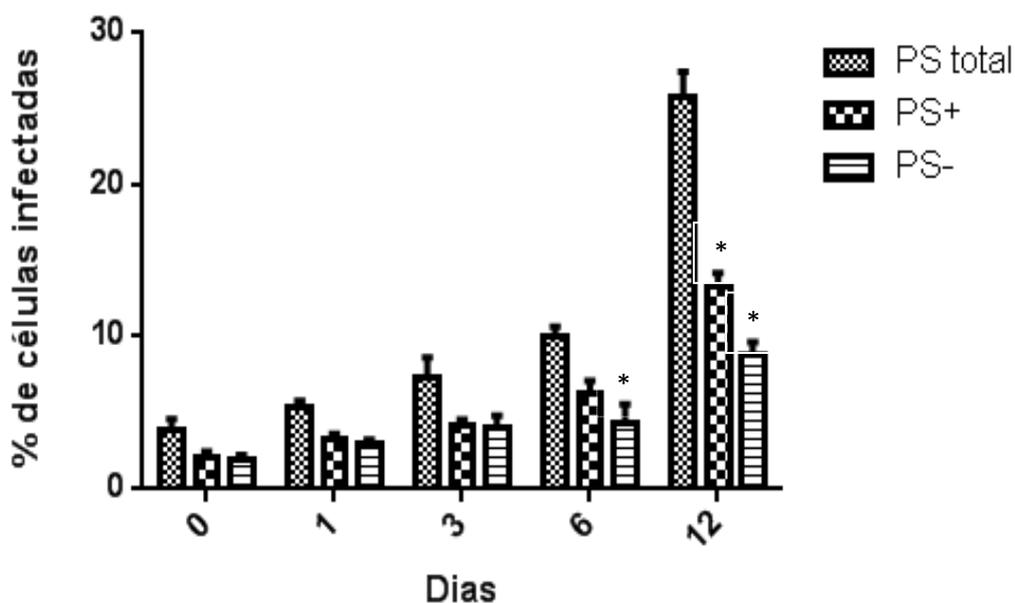


Fig. 4.13. Percentual de células infectadas com subpopulação de taquizoítos de *T. gondii* em CME. Infecção com subpopulações de taquizoítos de ME49, obtidos de cultura de células VERO e isolados em coluna magnética. Observa-se um maior percentual de células infectadas nas populações total e PS positivo em comparação com a população PS negativo. Essas diferenças com relação a subpopulação negativa foi significativa, * $P < 0,05$.

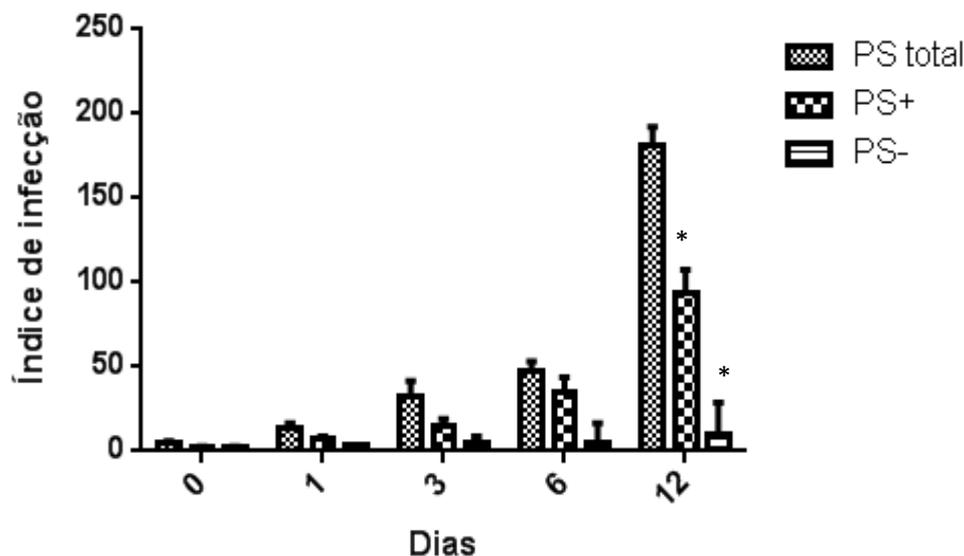


Fig. 4.14. Índice de infecção com subpopulação de taquizoítos de *T. gondii* em CME. Infecção com subpopulações de taquizoítos de ME49, obtidos de cultura de células VERO e isolados em coluna magnética. Observa-se um maior índice de infecção nas populações total e PS positivo em comparação com a população PS negativo. Essas diferenças com relação à subpopulação negativa foram significativas, * $P < 0,05$.

CME infectadas com as populações de taquizoítos total, PS⁺ e PS⁻ após 12 dias de infecção, analisadas por microscopia de fluorescência, mostraram parasitos marcados com P30 indicativo da presença de taquizoítos intracelulares (Fig. 4.15 C, G e L). Diferenças observadas quanto à capacidade infectiva como demonstrado nas análises quantitativas nas Fig. 4.13 e 4.14 mostram que a população PS⁻ apresenta menor número de células infectadas e de parasitos intracelulares (Fig. 4.15 I, L e M). Os ensaios em que as culturas foram incubadas com a lectina DBA não apresentaram, no período de observação, qualquer estrutura com reatividade para a lectina, portanto, não tendo sido detectado cisto nestas células (Fig. 4.15 B, F e J).

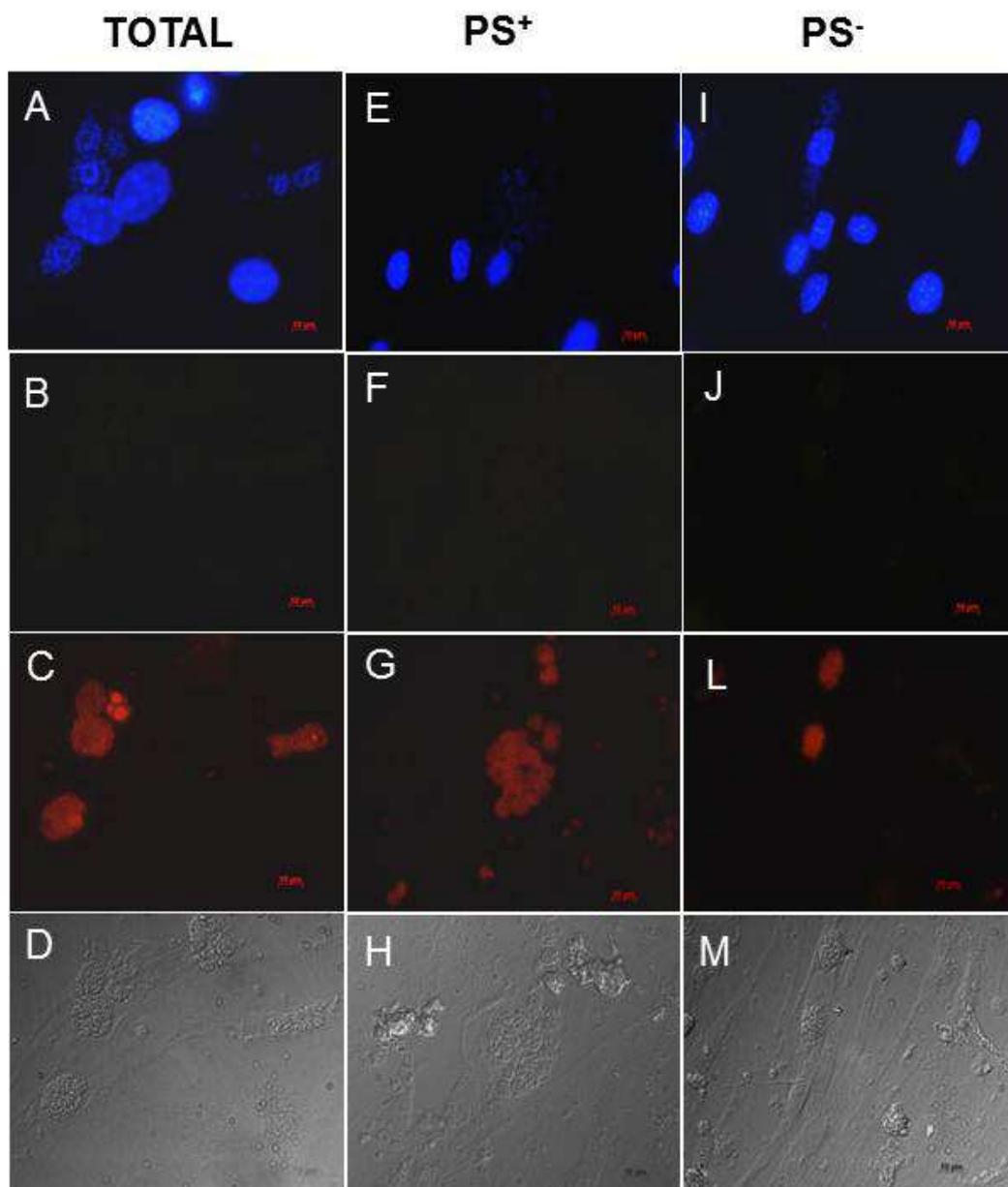


Fig. 4.15. Aspectos de culturas infectadas com subpopulações de taquizoítos de ME49 após 12 dias de interação. A-D: culturas infectadas com taquizoítos da população total, E-H: PS⁺ e I-M: PS⁻. Em azul a marcação do núcleo com DAPI; verde marcação com DBA (negativa) e em vermelho marcação dos parasitos com anticorpo P30. D, G e M: imagens de DIC.

4.3. Destino intracelular de subpopulações PS⁺ e PS⁻ de bradizoítos de *T. gondii* em culturas de linhagem de células musculares esqueléticas (C2C12).

Afim de identificar a incidência de cistogênese em culturas de C2C12 infectadas com populações total, PS⁺ e PS⁻ de bradizoítos, as células foram fixadas com PFA 4% e posteriormente incubadas com a lectina DBA e com o anticorpo P30 (reconhecimento de bradizoítos e taquizoítos, respectivamente). Estas marcações permitiram a quantificação da cistogênese a partir da infecção com cada subpopulação.

A figura 4.16 mostra o percentual de vacúolos marcados na população total e nas subpopulações PS⁺ e PS⁻ como revelados pela lectina DBA, atingindo cerca de 60% dos vacúolos positivos a partir de 12 dias de interação. Os resultados mostram que as populações de bradizoítos total e PS⁺ foram capazes de gerar maior número de células contendo vacúolos com cistos, em cerca de 3x maior quando comparados com PS⁻.

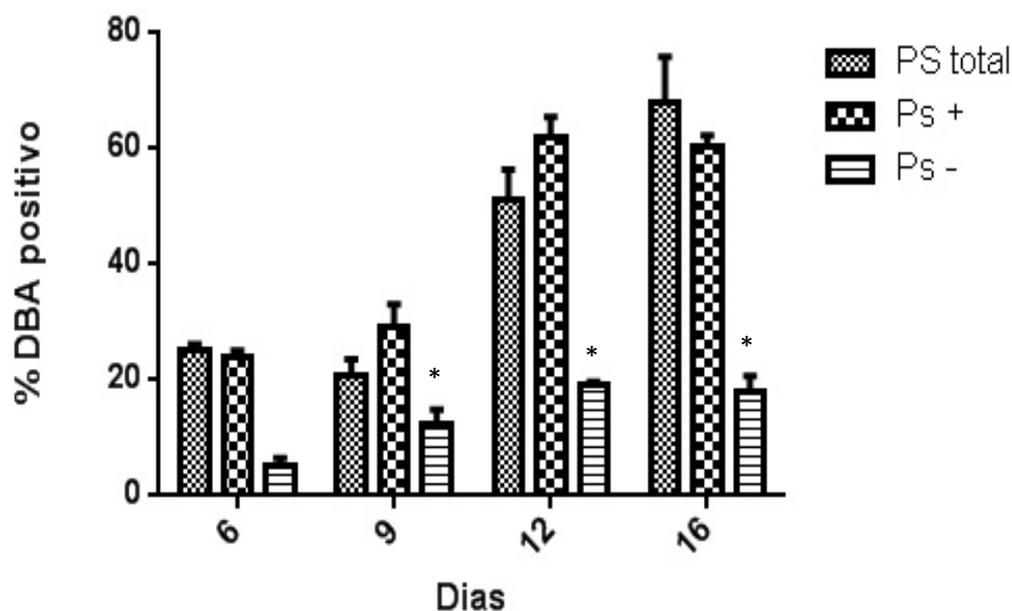


Fig 4.16 Quantificação total das lâminas quanto à cistogênese de *T. gondii* em C2C12. Infecção de C2C12 com subpopulações de bradizoítos de ME49, isolados de cérebro de camundongo. Observa-se um percentual maior de vacúolos marcados com DBA nas populações total e PS positivo em comparação a população PS negativo.*p<0,05

A quantificação do número total de cistos nas lâminas foi executada, demonstrando que o desenvolvimento da cistogênese foi tempo dependente e que as populações total e a PS⁺ foram capazes de produzir mais cistos que a população PS⁻ (Fig. 4.17). Essas diferenças do desenvolvimento da cistogênese dessas populações com relação à subpopulação negativa foram significativas. No entanto, a análise da cistogênese entre as populações total e a positiva para PS não foi considerada significativa.

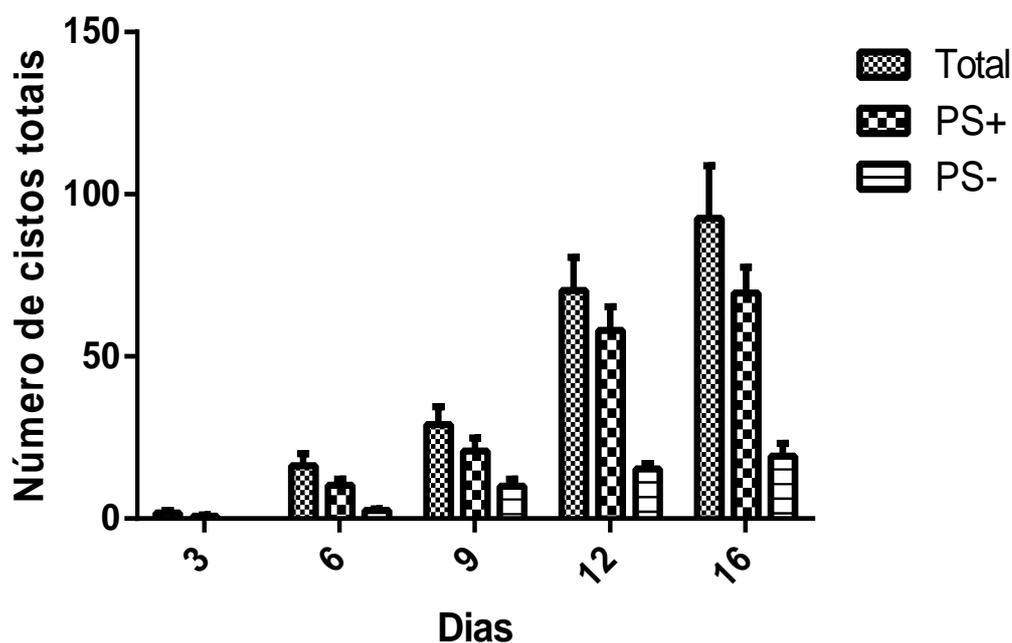


Fig. 4.17 Quantificação total das lâminas quanto ao desenvolvimento da cistogênese de *T. gondii* em C2C12. Infecção de C2C12 com subpopulações de bradizoítos de ME49, isolados de cérebro de camundongo. Observa-se um número maior de cistos nas populações total e PS positivo em comparação a população PS negativo.

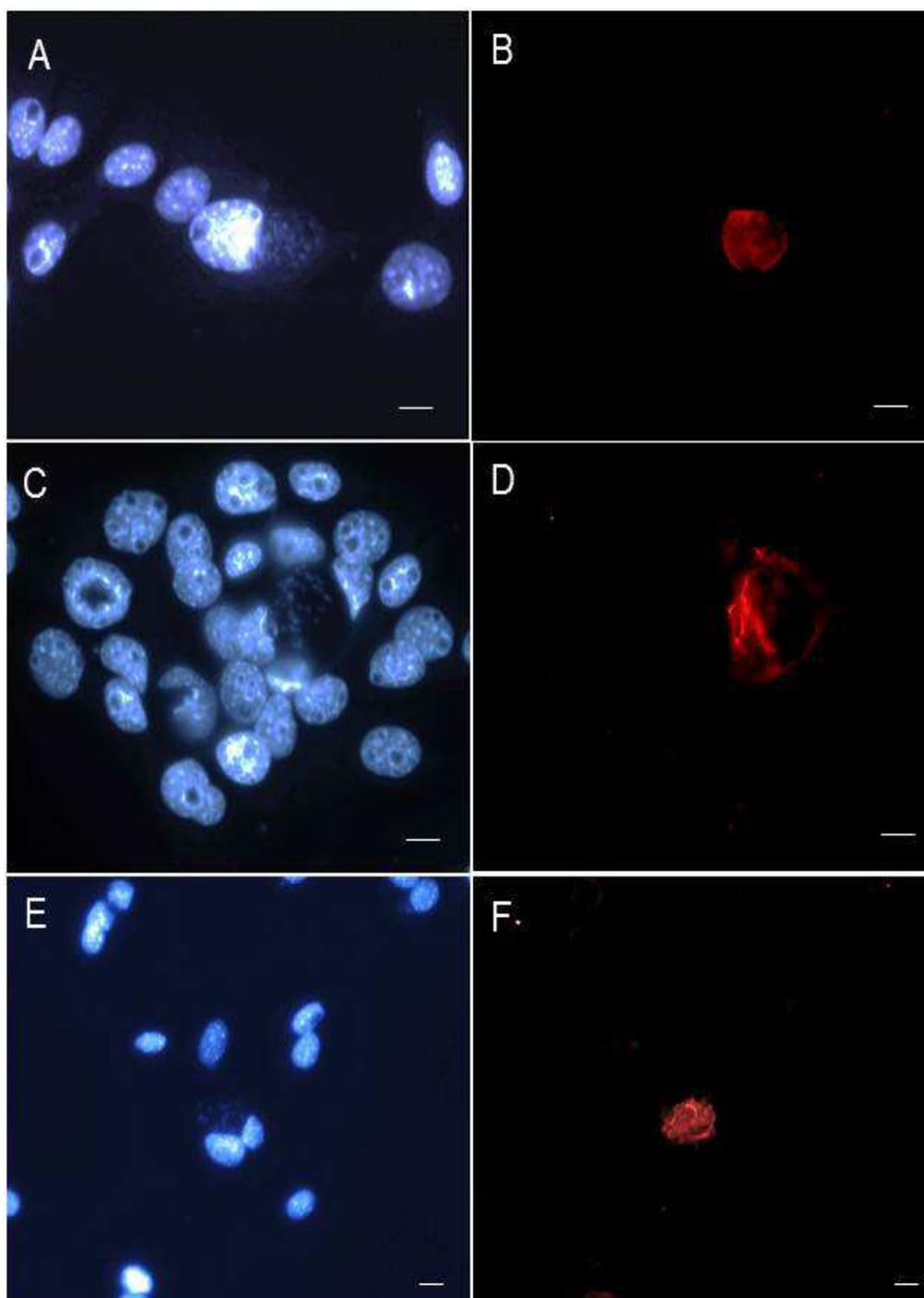


Fig. 4.18. Aspectos de culturas de células musculares esqueléticas infectadas com subpopulações de bradizoitos em C2C12. Observa-se cistogênese espontânea em células musculares esqueléticas infectadas com subpopulações de bradizoitos de ME49. A e B: infecção com população total; C e D: subpopulação PS⁺; E e F: culturas infectadas com subpopulação PS⁻. Azul: marcação do núcleo com DAPI; em vermelho marcação da parede cística com DBA-TRITC. Barras: 10 μ m

5. Discussão

A presente dissertação desenvolveu estudos aplicando células musculares esqueléticas como modelo de estudo da interação *T. gondii*-célula hospedeira. Esse modelo celular tem sido explorado pelo nosso grupo, dada a sua relevância como uma das principais vias de transmissão do parasito, por meio do consumo de carne crua ou mal passada (Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008, 2009; revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a, b; Gomes e cols., 2011; 2014).

Outra abordagem inovadora foi identificar subpopulações de parasitos que expressam fosfatidilserina na sua superfície, avaliando uma cepa tipo II, avirulenta, a ME-49 de *T. gondii*. Inicialmente, cistos isolados do cérebro de camundongos infectados foram analisados e numa outra vertente esse estudo comparou taquizoítos, obtidos de cultura de células, com bradizoítos isolados do cérebro de camundongos infectados quanto: (a) a presença de PS por monitoramento com anexina V e a visualização por microscopia de fluorescência; (b) ao percentual de formas positivas e negativas para PS nas duas formas infectivas por citometria de fluxo; (c) a capacidade infectiva da população total e das subpopulações positivas e negativas para ambos os estágios infectivos da cepa ME-49 em células musculares esqueléticas e ainda, (d) a interferência da exposição de PS na superfície desses parasitos (ambas as formas) no processo de desenvolvimento da cistogênese em células musculares esqueléticas, *in vitro*.

A proposta de se investigar o papel da fosfatidilserina nos estudos da interação *T. gondii*-célula hospedeira, se justifica pela sua estrutura química que lhe confere carga negativa e é um importante constituinte das membranas de células eucariotas envolvidas nas vias de sinalização. Essa sinalização é mediada por proteínas recrutadas e/ou ativadas pela PS, pela via de domínios que se reconhecem estruturalmente ou por interações eletrostáticas de membranas que são ricas em PS. Tais interações são fundamentais para ambas as cascatas de sinalização intracelular e extracelular. PS, exposto no meio extracelular, é fundamental dentre outras funções como um sinal de depuração de células apoptóticas (revisto em Kay e Grinstein, 2013).

Diante dessas propriedades, nós investigamos inicialmente a presença de PS na superfície de cistos teciduais de *T. gondii*, por meio da técnica de citometria de fluxo, após incubação com anexina V-FITIC, demonstrando que 92% dos cistos eram positivos. Esse achado corrobora dados publicados pelo nosso grupo (Guimarães e cols., 2007) demonstrando a presença de carga elétrica negativa na superfície de cistos teciduais, empregando dois marcadores catiônicos: (i) a ferritina cationizada - ligação eletrostática às moléculas com carga negativa e, (ii) o vermelho de rutênio, um corante inorgânico (átomos de oxigênio, rutênio e amina formando o complexo amina), com afinidade polianiônica, que reconhece os glicosaminoglicanos, moléculas altamente carregadas negativamente, conferida pelos grupamentos carboxilas e sulfatos, covalentemente ligados a proteínas para formar a molécula de proteoglicanos (90 a 95% de carboidratos) diferente das glicoproteínas (1 a 60% de carboidratos), que apresentam geralmente menos do que quinze resíduos de açúcar e tem como terminal, o ácido siálico, responsável pela negatividade da membrana da maioria das células eucarióticas. Sethi e cols. (1977), Derouin e cols. (1981) e Zhang e cols. (2001) têm demonstrado resíduos de carboidratos na superfície de cistos teciduais, embora nem resíduos de ácido siálico e nem glicosaminoglicanos ainda tenham sido identificados. A natureza dos componentes aniônicos da parede cística foi parcialmente desvendada pelo tratamento com diferentes enzimas e somente a fosfolipase A2 foi eficaz em reduzir, não eliminar, a expressão de sítios aniônicos da sua superfície, indicando que a carga elétrica em cistos fosse dada parcialmente por alguns grupos da cauda dos ácidos graxos que se ligam ao carbono 2 do glicerol (Guimarães e cols., 2007). A incapacidade de negativar a expressão de sítios aniônicos com esse tratamento, pode ter relação com a expressão de PS na superfície de cistos, como demonstrado no presente estudo, cuja porção fosfato está na posição SN-3 da estrutura do glicerol, provavelmente fora do alcance da ação da fosfolipase A2.

Outro aspecto que merece atenção é o conhecido papel da PS na regulação da apoptose em resposta a certos estímulos dependentes de cálcio. Após transferência para o folheto exterior da membrana da célula, acredita-se que um receptor na superfície de macrófagos ou de células relacionadas com a limpeza, reconheça a fosfatidilserina e facilite a remoção das células

apoptóticas e os seus conteúdos potencialmente tóxicos ou imunogênicos de uma forma não inflamatória (Buckland e Wilton, 2000; Chaurio e cols., 2009). A nossa equipe do Laboratório de Biologia Estrutural tem mostrado interesse em entender os mecanismos que estão envolvidos no estabelecimento da fase crônica da toxoplasmose, por meio da infecção de camundongos via intraperitoneal com cistos de *T. gondii*. Não existem enzimas proteolíticas capazes de romper a parede cística e liberar os bradizoítos no peritônio para seu acesso às células mononucleadas e assim seguir seu desenvolvimento intracelular e o estabelecimento da infecção. Algumas tentativas foram feitas no laboratório visando monitorar o caminho percorrido pelos cistos até alcançarem e serem recolhidos do cérebro após 45 dias de infecção. Embora os resultados sejam preliminares, algum sucesso obtivemos ao localizá-los no interior de macrófagos. Um estudo sistematizado sempre foi o objetivo do Laboratório, mas diante do quadro aqui apresentado, da exposição de PS na superfície dos cistos com um percentual de quase 92% nessas condições, não seria leviano considerar que a via do mimetismo de apoptose exercido pela parede cística, poderia ser uma alternativa de fagocitose e transporte dos cistos no organismo. Entender os mecanismos moleculares e a resposta celular à invasão de cistos e a posterior liberação dos parasitos para a manutenção do seu ciclo celular é um desafio que se apresenta.

A detecção da exposição de PS empregando a proteína anexina V conjugada a um fluorocromo tem sido uma metodologia atrativa que tem como alvo de ligação a PS extracelular, pois não é tóxica ou destrutiva, permitindo a análise de uma única célula ou do organismo como um todo. Embora, o seu uso seja bastante difundido para análise de células apoptóticas, esse não é um parâmetro único, pois propriedades integradas de membrana também mudam drasticamente durante a apoptose e dessa forma, tem sido sugerido a busca de novos métodos de detecção para esse fim (revisto em Demchenko, 2012). À parte dessa discussão, os cistos incubados com anexina V por 20 minutos permitiu a visualização do PS por meio da microscopia confocal, com marcação na parede cística e no interior desses cistos. Não é possível, com a resolução do microscópio, afirmar que os bradizoítos intracísticos estejam de fato marcados ou que a marcação corresponda ao espaço da matriz do cisto, entre os parasitos. É tentador analisar essa questão por métodos ultraestruturais,

mas existem as limitações técnicas, que impedem a revelação da PS, após processamento de material biológico para microscopia eletrônica. Estruturas pequenas como cistos e com vários parasitos confinados no seu interior, não permitem delimitar com precisão a localização da anexina por microscopia confocal. Experimentos anteriores com cistos para revelação de proteínas de matriz cística, como laminina e fibronectina, por microscopia confocal indicava a localização da proteína na parede cística, porém a análise ultraestrutural revelou que as proteínas estavam na região granular, abaixo da membrana que reveste o cisto e a marcação no interior do cisto, correspondia a localização dessas proteínas em organelas secretoras de bradizoítos, como róptrias e micronemas, principalmente (Guimarães e cols., 2010). A revelação de PS no interior dos cistos não era esperada, tendo em vista que a incubação com PI indicou integridade da parede cística nas nossas condições experimentais. No entanto, Lemgruber e cols. (2011) testando se a parede cística era permeável a diferentes fluorocromos, demonstrou que moléculas de até 40kDa foram capazes de alcançar a parede cística, como o *Lucifer yellow* e Dextran-rodamina. Considerando-se que a molécula de anexina-FITIC é de tamanho relativamente pequeno (36kDa), assim dentro dessa perspectiva, a entrada do marcador no interior do cisto seria aceitável (Kuypers e cols., 2007). As questões que agora se colocam são: bradizoítos intracísticos expressam PS na sua superfície? A marcação seria no interior dos bradizoítos? Seriam essas moléculas secretadas pelos parasitos e carregadas através das vesículas encontradas na matriz cística que se incorporariam/fundiriam à parede do cisto e, por conseguinte expressando na sua superfície fosfatidilserina? A origem da parede cística é ainda uma questão mal resolvida. Alguns autores acreditam que esta seja oriunda da modificação da membrana do vacúolo parasitóforo, por meio da secreção de proteínas dos parasitos, sem clareza se essas modificações ocorrem por sinalização dos taquizoítos em processo de diferenciação em bradizoítos ou pelos já bradizoítos. Existem correntes que acreditam que as vesículas secretadas pelos parasitos e localizadas na matriz seriam os responsáveis pela composição da parede cística e sua manutenção, dado o aumento de sua área de superfície com o amadurecimento dos cistos (Weiss e Kim, 2000; Lemgruber e cols., 2011) Outra corrente tem demonstrado a capacidade endocítica da parede cística por diferentes marcadores e que as

vesículas e túbulos situados na matriz cística incorporam esses marcadores, indicativo de um processo de transporte para os bradizoítos, que são dependentes de nutrientes, considerando-se que permanecem no organismo por toda a vida do hospedeiro (Guimarães e cols., 2007). Há de se considerar a existência coordenada dos dois fluxos. Essas são indagações que ficaram em aberto, criando a perspectiva de novas abordagens e induzindo a busca de ferramentas que possam esclarecer esses pontos. Um detalhe que não se pode perder de vista, é a “construção” da membrana do vacúolo: a membrana se invagina e o folheto interno da membrana da célula hospedeira passa a ser a face externa da membrana do vacúolo. Teoricamente, como a PS é pela sua natureza localizada nesta face da membrana, essa “poderia” ser uma sugestão do porque que a parede do cisto, que advém da membrana do vacúolo, contenha PS na sua superfície...

Ainda outro aspecto que poderia ser discutido é a questão da recrudescência dos cistos em processos de imunossupressão do hospedeiro. Fica a pergunta se essa “reativação” da fase aguda implicaria sempre no rompimento dos cistos e liberação dos bradizoítos com diferenciação intracelular em taquizoítos ou esses cistos com expressão de PS seriam diretamente fagocitados, “facilitando”, assim a manutenção da infecção crônica, com baixo gasto energético da maquinaria dos parasitos durante a conversão.

A importância de se estudar a fosfatidilserina no contexto desta dissertação tem origem da sua exposição em patógenos e em células apoptóticas e pelo fato de que os dois são fagocitados. Em ambos os casos, o processo de fagocitose tem uma diferença crucial: enquanto o patógeno ativa a resposta inflamatória protetora do hospedeiro, as células apoptóticas induzem a uma resposta não inflamatória (Torchinsky e cols., 2010; revisto em El-Hani e cols., 2012). Em modelos utilizando *Leishmania amazonensis* foi evidenciado que as diferentes origens dos hospedeiros poderiam modular essa expressão dependente do sistema imunológico do mesmo. Amastigotas isoladas de lesões de camundongos BALB/c (suscetíveis à leishmaniose), expõem significativamente mais PS na superfície que quando isoladas de camundongos C57BL/6 (resistentes à doença) (Wanderley e cols., 2006; 2009) enquanto as amastigotas de *L. major* apresentam exposição de PS baixa e constante ao

longo das semanas de infecção (Deolindo, 2008). O mesmo grupo também demonstrou que diferentemente do que acontece com amastigotas, que as promastigotas expondo PS são células não viáveis, não-infecciosas, morrendo por apoptose (Wanderley e cols., 2009).

Assim, a estratégia nesta dissertação foi buscar identificar PS na superfície de dois diferentes estágios infectivos de *T. gondii* de uma cepa tipo II (ME-49), uma abordagem que se diferencia do que vem sendo estudado por outros autores (Seabra e cols., 2004, DaMatta, 2006), tendo em vista que esta apresenta alta capacidade de estabelecer a cistogênese em sistemas *in vivo* e *in vitro* (revisto em Weiss e Kim, 2000; Guimarães e cols., 2008). Os isolados de *T. gondii* são identificados por três genótipos: tipos I, II e III e as diferenças ocorrem quanto à virulência e epidemiologia. Linhagens do tipo I, como a RH, são altamente virulentas, formam menos cistos em cultura e em animais, e têm sido frequentemente associadas com a toxoplasmose ocular em pacientes imunocomprometidos (Boothroyd e Grigg, 2002; Kim e Weiss, 2004). As linhagens do tipo II, como a ME49, são cepas menos virulentas e cistogênicas. A maioria das cepas do genótipo III é isolada de animais e são moderadamente virulentas (Howe e Sibley, 1995; revisto em Weiss e Kim, 2000; Ajzenberg e cols., 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004). As análises da exposição de PS em *T. gondii* tem se limitado ao uso de taquizoítos, forma proliferativa do parasito, da cepa RH (Seabra e cols., 2004; Dos Santos, 2011). Assim, aqui empregamos inicialmente taquizoítos da cepa ME-49 do *T. gondii* a partir da infecção de células Vero com bradizoítos obtidos do cérebro de camundongos C57/BL6 infectados. Após 4-5 dias de infecção de células Vero, o sobrenadante foi recolhido e as análises por citometria e microscopia confocal foram realizadas. Nossos ensaios experimentais analisando a superfície de taquizoítos da cepa ME-49, já traz dados novos, mostrando que esses taquizoítos oriundos de cultura de células apresentam cerca de 69% dos parasitos positivos para PS, contra os cerca de 52% dos taquizoítos da cepa RH obtidos do peritônio de camundongos suíços (Seabra e cols., 2004). Então, embora o *Toxoplasma* só tenha uma espécie, este apresenta três genótipos com características peculiares, como já citados. Neste caso, a exposição de PS também difere entre as cepas. O aspecto comportamental biológico (como

virulência, mortalidade, patogenia e etc) dessas cepas estudadas já é uma hipótese que tem que ser considerada, como uma forte candidata à geração dessas diferenças. Então, os taquizoítos oriundos da cepa tipo II, ME-49 geneticamente estão destinados a encistar e parte desses taquizoítos poderão realizar o ciclo lítico e expandir a infecção quer no sistema *in vivo* como *in vitro*. A maior exposição destes parasitos ao sistema imune aumenta a chance de serem fagocitados e garantem as duas vias de desenvolvimento intracelular. Já os taquizoítos de RH, mesmo sendo menos fagocitados, pela sua alta capacidade multiplicativa estariam aptos a desenvolver com sucesso seu ciclo lítico e expansão da infecção em novas células. Além disso, os taquizoítos obtidos de cultura celular apresentam maior exposição de PS, o que poderia ser explicado pela inexistência de fatores imunológicos que poderiam suprimir a expressão de PS, como previamente sugerido por Wanderley e cols. (2009) para Leishmania.

Outro dado inédito deste trabalho foi a evidenciação de que formas bradizoítas também expõem PS na sua superfície numa taxa de quase 60% dos parasitos isolados do cérebro de camundongos infectados. Considerando-se que a transmissão do protozoário tem como uma das principais fontes de infecção a ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos de *T. gondii*, se após a digestão da parede cística, esses parasitos são rapidamente sequestrados por macrófagos ou penetram em células intestinais para cumprirem seu papel de difusores da infecção *in vivo* ou no estabelecimento da infecção crônica por meio do encistamento, não é de se surpreender que o mimetismo apoptótico, também esteja favorecendo a fagocitose desses bradizoítos.

A presença de PS em outros protozoários vem sendo explorada por vários grupos que apontam alguns elementos biológicos que merecem ser apresentados aqui (Balanco e cols, 2001; Wanderley e cols., 2006; Wanderley e Barcinski, 2010), para o entendimento geral da proposta do tema e do entendimento dos resultados obtidos no presente trabalho. A exposição de PS é também o que melhor caracteriza uma célula em processo de morte apoptótica (Fadok e cols., 1998), sendo também a que define o mimetismo por apoptose. A exposição de PS desempenha um papel importante nas etapas de

reconhecimento celular e englobamento no processo de fagocitose. Nos últimos anos a busca por um receptor específico para expor PS perdeu força (Fadok e cols., 2000; Henson e cols., 2001) e hoje em dia é quase consensualmente aceito que várias diferentes moléculas, em profissional e não-profissional fagócitos, são capazes de reconhecer PS diretamente ou serem opsonizadas por fatores solúveis (Bratton e Henson, 2008).

Esses mecanismos de mimetismo apoptótico tem sido incorporados à biologia de alguns protozoários, como inicialmente estudados em *Trypanosoma cruzi* (Ameisen, 1995), *Trypanosoma brucei* (Welburn, 1996) e *Leishmania amazonensis* (Moreira e cols., 1996). Estudos mais recentes apontam que em *L. amazonensis* os mecanismos de evasão pela exposição de PS estão envolvidos no processo de internalização pelos macrófagos induzindo a desativação microbicida dessas células, por meio da indução da secreção de TGF- β 1, aumento da síntese da interleucina (IL)-10 e inibição da produção de NO (Barcinski e cols., 2003; Balanco e cols., 2001; Wanderley e cols., 2006; Wanderley e Barcinski, 2010). De particular ainda, temos a introdução de célula não fagocítica profissional, como a célula muscular esquelética nessas abordagens, o que amplia o leque da investigação do papel da PS em outros sistemas, que não exclusivamente macrófagos e também seu papel na cistogênese.

Os estudos com *T. gondii* conduzidos prioritariamente pelos grupos de DaMatta e de Seabra tem investigado os mecanismos que operam na evasão de subpopulações de taquizoítos de cepa tipo I, virulenta, frente à resposta microbicida de macrófagos. Assim como em outros protozoários, os estudos com *T. gondii* mostram que a invasão dos parasitos ativamente nas células inibe a produção de NO, permitindo sua persistência intracelular, levando ao aumento da produção de TGF- β que é dependente da exposição de PS, com destaque pelos macrófagos infectados por parasitos que expõem PS (Seabra e cols., 2004). Esses estudos demonstraram que o *T. gondii* imita o mecanismo de evasão utilizado por *L. amazonensis*, e também da resposta anti-inflamatória evocada por células apoptóticas, à semelhança dos descritos para *Leishmania* (Barral-Netto e cols., 1992) e *Trypanosoma cruzi* (Ming e cols., 1995), considerando-se que todos tem TGF- β 1 como a molécula central de indução da desativação de macrófagos.

É interessante notar que como a *Leishmania*, o *T. gondii* mimetiza células em apoptose, exibindo subpopulações de parasitos expondo na sua superfície PS, independente da cepa e da forma infectiva empregada, como demonstrado aqui com as formas taquizoítas e bradizoítas da cepa ME-49. Há de se ressaltar que diferenças existem no percentual de positividade, que como já discutido anteriormente, pode estar relacionado com as propriedades genéticas de cada cepa. De qualquer forma, como proposto por Balanco e cols. (2001), Barcinski e cols. (2003) e Moreira e cols. (2004), a exposição de PS não necessariamente procede à morte celular por apoptose, mas pode, para muito mais além, corresponder a um mecanismo de adaptação conservado usado por protozoários parasitos intracelulares e células tumorais para escapar de macrófagos ativados. É especulada também, a possibilidade de que a infecção por *T. gondii* também interfira com a sinalização do macrófago por vias independentes do TGF- β .

Foi observado que populações que expõem PS invadem ativamente macrófagos e aquelas que não expõem, entram por processo fagocítico, não e não são capazes de entrar em célula não fagocítica (Dos Santos, 2011). Macrófagos são células diferenciadas do sistema mononuclear fagocítico e fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imunológico (Loose e Van de Wiele, 2009). Em estudos ultraestruturais envolvendo outras células fagocíticas profissionais, os neutrófilos, ficaram evidenciados três processos diferentes de penetração do *T. gondii* nessas células, que inclui a formação de projeções na superfície da célula hospedeira, sua invaginação e também a formação de túnel (MacLaren e cols., 2004). A célula muscular esquelética não é uma célula fagocítica profissional, no entanto dados do nosso grupo apontam que esta célula apresenta os mesmos aspectos estruturais durante a penetração do *T. gondii* que foram descritos em neutrófilos (Ferreira-da-Silva e cols, 2009). Os dados apresentados no presente estudo mostram que a população negativa foi capaz de penetrar na célula muscular e se proliferar. A hipótese de que somente os parasitos que invadem as células por penetração ativa, seriam viáveis contrapõe os resultados descritos neste trabalho, onde nossos dados indicam que parasitos que não expõem PS foram capazes de penetrar, proliferar e até encistar em CME. Os mecanismos moleculares que participam desta interação é um campo ainda em aberto.

A exposição de PS em bradizoítos e taquizoítos da cepa ME-49, de acordo com o que tem sido proposto para macrófagos, tornaria esses parasitos mais infectivos ou mais “fagocitáveis”, como proposto por Dos Santos e cols. (2011) no sistema *in vivo*. Neste contexto, nossos resultados mostram que a população total e a subpopulação PS⁺ foram competentes em invadir e encistar em CME. No entanto, a relação parasito-célula hospedeira utilizada neste trabalho, em particular com as formas bradizoítos em função de restrições técnicas para obtenção de parasitos em grandes quantidades, minimizou o número de células infectadas, mas as diferenças inerentes a cada subpopulação e a população total, foi bastante perceptível. Estudos anteriores utilizando taquizoítos da cepa RH a proporção parasito/célula foi de 10:1. O número de bradizoítos de ME49 nesta proporção é limitado, pois a passagem pela coluna para isolar as subpopulações mostra que menos de 5% dos parasitos são recuperados. No caso da população PS⁺ o índice de recuperação é ainda menor, chegando a menos de 1% do total de parasitos submetidos à passagem na coluna magnética. Para reverter essas dificuldades foi utilizado proporção parasito/célula de 1:10 que corresponde a 10x menos do que com taquizoítos e via de regra é a proporção utilizada para se estudar a cistogênese *in vitro*, tendo em vista que a utilização de proporção muito superiores a essa poderia favorecer o desenvolvimento do ciclo lítico do parasito (De Munro e cols., 2014), reduzindo a cistogênese neste sistema. A maior proporção parasito/célula utilizada foi em infecções com taquizoítos de ME-49, que são consideravelmente mais fáceis de obtenção. Em experimentos com taquizoítos de ME-49 foi utilizado a proporção parasito/célula 1:1, que foi a proporção máxima para que as culturas se sustentassem por períodos mais longos, pois havia o interesse de se avaliar a cistogênese. No entanto, essas culturas, apesar de sua viabilidade por períodos longos de infecção, não apresentaram cistos teciduais. Há de se considerar que a indução de formação de cistos (com pH alcalino ou com droga) não foi aplicada em nenhum dos experimentos aqui apresentados.

Devido às baixas proporções parasito/células utilizadas, essas culturas mantiveram baixos níveis de infecção. No entanto, as diferenças de infectividade entre as subpopulações puderam ser avaliadas. A subpopulação PS⁺ de bradizoítos apresenta um índice de infecção maior que a população PS⁻

e o índice de infecção da população PS⁺ também se apresentou muito próximo ao da população total, não demonstrando diferença significativa. Em taquizoítos de ME-49 a diferença entre a população total e as subpopulações se mostrou ainda maior, em função da infecção com uma proporção parasito/célula maior. A população total de taquizoítos apresentou um percentual de células infectadas maior que as subpopulações e essa diferença foi significativa tanto na comparação com PS⁺, quanto na comparação com PS⁻. Na comparação entre as subpopulações, o percentual de células infectadas não apresentou diferença significativa entre as populações PS⁻ e PS⁺. Quando analisados os índices de infecção, a população total também apresentou um índice maior que as subpopulações. Após 6 dias de interação com população total, esse índice ficou muito próximo ao do PS⁺ e nos demais dias a diferença foi significativa. Os índices de infecção com a população PS⁻ se mostrou muito menor que a população total e PS⁺ e mostrou diferença significativa. Esses dados nos indicam que a subpopulações de taquizoítos da cepa ME-49 tem menor capacidade de infectar as células, mas quanto à capacidade proliferativa, a subpopulação PS⁺ foi mais competente em se multiplicar na célula que os PS⁻. Esses dados estão coerentes com os apresentados da infecção com taquizoítos em macrófagos. Neste sistema, as subpopulações apresentaram um índice de infecção menor que a população total, sendo a PS⁺ a mais infectiva entre as subpopulações, sugerindo que ocorra um sinergismo entre as subpopulações (Dos Santos e cols., 2011). No entanto, esses dados se mostram diferentes dos apresentados por bradizoítos, onde a subpopulação PS⁺ apresentou índices de infecção próximos ao da população total. Talvez a baixa proporção parasito/célula tenha sido um fator interveniente nesses resultados, reduzindo a proposta de que ocorra sinergismo entre as subpopulações, principalmente porque bradizoítos tendem ao encistamento espontâneo em células musculares esqueléticas, enquanto taquizoítos tendem a se multiplicar e estabelecer o ciclo lítico.

As células musculares foram escolhidas para avaliar a capacidade destes parasitos quanto ao encistamento. Esse modelo vem sendo utilizado pelo nosso grupo e se mostrado capaz de reproduzir a cistogênese espontaneamente, sem qualquer indução química ou física (revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008). Nos experimentos aqui apresentados, as

culturas infectadas com bradizoítos foram capazes de encistar espontaneamente. Para acompanhamento da cistogênese foi utilizada a marcação com DBA e o anticorpo anti-SAG e a quantificação foi realizada pela contagem do número total de cistos nas lamínulas, identificando os vacúolos marcados contendo cistos e taquizoítos. Esses dados mostraram que a população total e a população PS⁺ de bradizoítos não apresentaram diferenças significativas na capacidade de formar cistos, enquanto a população PS⁻ gerou cistos cerca de 3x menos do que a população total e 2,5x menor que a subpopulação PS⁺ nestas culturas.

O conjunto de dados apresentado aqui aponta que as subpopulações PS⁺ e PS⁻ juntas e as PS⁺ foram mais eficazes na infecção e também no estabelecimento da cistogênese em células musculares esqueléticas, exclusivamente frente a infecção com bradizoítos. Os mecanismos moleculares que governam esses eventos de reconhecimento celular e o destino intracelular de *T. gondii* que expõem ou não PS em células musculares esqueléticas abre novas perspectivas de investigação. Considerando-se as peculiaridades destas células fora da missão primordial de vigilantes do sistema imune, mas com respostas celulares, promovendo o aumento da produção de citocinas como, INF-gama e IL-12 indicadores inflamatórios, aumentados durante a infecção de *T. gondii* nessas células, como demonstrado em Gomes e cols. (2014). O controle e resposta celular frente à invasão pelo *T. gondii* devem contribuir para o estabelecimento e manutenção da fase crônica da infecção na célula muscular.

6. CONCLUSÕES

a) A revelação de que cistos teciduais de *T. gondii* expõem PS na parede cística e no seu interior poderia explicar a eficiência da manutenção da infecção durante a recrudescência dos cistos, garantindo sua manutenção no organismo;

b) Bradizoítos e taquizoítos de ME-49 são diferentes quanto a exposição de PS (59% e 69%, respectivamente) o que pode ser explicado pela diferença genotípica e comportamento biológico entre esses estágios.

c) As subpopulações PS⁺ de taquizoítos e bradizoítos foram capazes de infectar CME em índices semelhantes à população total, enquanto os PS⁻ apresentaram menor capacidade de invasão. Essas diferenças podem estar relacionadas ao mimetismo da apoptose desenvolvida por esses parasitos, garantindo o sucesso da infecção.

d) A alta eficiência da subpopulação PS⁺ de bradizoítos em invadir e formar cistos em CME sugere que essa subpopulação seja a principal protagonista do estabelecimento da cistogênese, *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander D.I., 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 Pathogens* 1: e17.
- Ajzenberg D., Cogné N., Paris L., Bessières M.H., Thulliez P., Filisetti D., Pelloux H., Marty P., Dardé M.L. (2002). Genotype of *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186: 684-689.
- Andree H.A., Reutelingsperger C.P., Hauptmann R., Hemker H.C., Hermens W.T., Willems G.M. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 265: 4923-4928.
- Ameisen J.C., Idziorek T., Billaut-Mulot O., Loyens M., Tissier J.P., Potentier A., Ouaiissi A. (1995). Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ* 2: 285-300.
- Arikketh D., Nelson R., Vance J.E. (2008). Defining the importance of phosphatidylserine synthase-1 (PSS1): unexpected viability of PSS1-deficient mice. *J Biol Chem* 283: 12888–12897.
- Balanco J.M.F., Moreira M.E., Bonomo A., Bozza P.T., Amarante-Mendes G., Pirmez C., Barcinski M.A. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11: 1870-1873.
- Barbosa H.S., Pereira M.C.S., Meirelles M.N.L. (2000). Protocolos de culturas primárias. Cap. 18.2 In: Doença de Chagas: Manual para experimentação animal, Tania Araújo-Jorge e Solange Lisboa de Castro (org), Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, pp 297-313.
- Barbosa H.S., Silva M.F.F., Guimarães E.V., Carvalho L., Rodrigues R.M. (2005). Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J Parasitol* 91: 182-184.
- Baer F., Maurukas J. (1955). Phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 212: 25-38.
- Barragan A., Brossier F., Sibley L.D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* 7: 561-568.
- Barragan A., Sibley L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers *Trends Microbiol.* 11 pp. 426–430
- Barral-Netto M., Barral A., Brownell C.E., Skeiky Y.A., Ellingsworth L.R., Twardzik D.R., Reed S.G. (1992). Transforming growth factor- β in

Leishmania infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545–548.

Barcinski M.A., Moreira M.E., Balanco J.M., Wanderley J.L., Bonomo A.C. (2003). The role of apoptotic mimicry in host–parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior, *Kinetoplastid Biol Dis* 2: 6-7.

Bratton D.L., Henson P.M. (2008). Apoptotic cell recognition: will there be a phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr. Biol.* 18, R76–R79.

Bergo M.O., Gavino B.J., Steenbergen, R. (2002). Defining the importance of phosphatidylserine synthase 2 in mice. *J Biol Chem* 277: 47701-47708.

Berkes C.A., Tapscott S.J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16: 585-595. Review

Bohne W., Gross U., Heesemann J. (1993). Differentiation between mouse-virulent and - avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. *J Clin Microbiol* 31: 1641-1643.

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.

Bohne W., Holpert M., Gross U. (1999). Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiol* 201: 248-254. Review.

Black M.W., Boothroyd J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 607-623. Review.

Blackman M.J., Carruthers V.B. (2013). Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol* 16: 459-464.

Boon J.M., Smith B.D. (2002). Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Med Res Rev* 22: 251–281.

Boothroyd J.C., Dubremetz J.F. (2008) Kiss and Spit: The dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 79-88.

Boothroyd J.C., Grigg M.E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5: 438-442. Review.

Brossier F., Sibley L.D. (2005). *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2266-2272.

Buck M.J., Atchley W.R. (2003). Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *J Mol Evol* 56: 742-750

Buckland A.G., Wilton D.C. (2000). Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochim Biophys Acta* 1483: 199-216.

Buguliskis J.S., Brossier F., Shuman J., Sibley L.D. (2010). Rhomboid 4 (ROM4) Affects the processing of surface adhesins and facilitates host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 6: e1000858.

Caldas L.A., de Souza W., Attias M. (2010). Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. *Vet Parasitol* 167: 8-18.

Carlier Y., Truysens C., Deloron P., Peyron F. (2012). Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop* 121: 55–70.

Carruthers V.B, Boothroyd J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol* 10: 83-89.

Carruthers V.B., Giddings O.K., Sibley L.D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1: 225-235.

Carruthers V.B., Sibley L.D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 31: 421-428.

Cavalier-Smith T. (1993). King Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Review* 57: 953-994.

Cenci-Goga B.T., Rossitto P.V., Sechi P., McCrindle C.M.E., Cullor J.S. (2011). *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An old parasite of new concern foodborne pathogens and disease 8: 751-762.

Cesbron-Delauw M.F., Gendrin C., Travier L., Ruffiot P., Mercier C. (2008). Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* 9: 657-664.

Charge S.B., Rudnicki M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238. Review.

Chaurio R.A., Janko C., Munoz L.E., Frey B., Herrmann M., Gaipf, U.S. (2009) Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* 14: 4892-4914.

Coppens I., Dunn J.D., Romano J.D., Pypaert M., Zhang H., Boothroyd J.C., Joiner K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125: 261-274.

Cowper B., Matthews S., Tomley F. (2012). The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. *Mol Biochem Parasitol* 186: 1–10.

Current W.L., Upton S.J., Long P.L. (1990). Taxonomy and life cycles. In: Coccidiosis of man and domestic animal. Ed. Long, P.L., Boca Raton: CRC press 2-16.

Dardé M.L., Bouteille B., Leboutet M.J., Loubet A., Pestre-Alexandre M. (1989). *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. *Ann Parasitol Hum Comp* 64: 403-411.

DaMatta R.A., Seabra S.H., Deolindo P., Arnholdt A.C.V., Manhães L. (2006). Goldenberg S, Souza W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 266: 29-33.

De Haan R.L. (1965). Development of pacemaker tissue in the embryonic chick heart cells in tissue culture. *Ann N Y Acad Sci* 127: 7-18.

De Lucca C. (1966). Effects of mode of culture and nutrient medium on cyclic variations in enzyme activities of mammalian cells cultured *in vitro*. *Exp Cell Res* 43: 39-50.

Demchenko A.P. (2012). The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Exp Oncol* 34: 263-268. Review.

Deolindo P. (2008). Exposição de fosfatidilserina em amastigotas intracelulares de *Leishmania (L) amazonensis* e seu papel na modulação da resposta macrofágica / Poliana Deolindo. – Rio de Janeiro, 2008. viii, 128 f.: il.; 30 cm. Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular.

Derouin F., Beauvais B., Lariviere M., Guillot J. (1981). Binding of fluorescein-labelled lectins on trophozoites and cysts of 3 strains of *Toxoplasma gondii*. *C R Seances Soc Biol Fil* 175: 761-768.

De Souza W., Martins-Duarte E.S., Lemgruber L., Attias M., Vommaro R.C. (2010). Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica (Porto Alegre)* 20: 131-143.

Dobrowolski J. M., Carruthers V. B., Sibley L. D. (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol* 26: 163-173.

Dos Santos T.A., Portes J.A., Damasceno-Sá J.C., Caldas L.A., Souza W.D., 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: e27867.

Dubińska-Magiera M., Jabłońska J., Saczko J., Kulbacka J., Jagla T., Daczewska M. (2014). Contribution of small heat shock proteins to muscle development and function. *FEBS Lett.* 588: 517-530. Review.

Dubey J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol . 28: 1019-1024. Review.

Dubey J.P., Frenkel J.K. (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J Protozool 19: 155-177.

Dubey J.P., Frenkel J.K. (1998). Toxoplasmosis in rats: a review with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. Vet Parasitol 77: 1–32.

Dubey J.P., Jones J.L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol 38: 1257–1278.

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 Rev 11, 267-299.

Dubey J.P. (1988). Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am J Vet Res 49: 910-913.

Dubey J.P. (1996). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. Vet Parasitol 64: 65-70.

Dubey J.P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*: the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 55: 467-475.

Ehrt S., Schnappinger D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* virulence: lipids inside and out. Nat Med 13: 284–285.

El-Hani C.N., Borges V.M., Wanderley J.L., Barcinski M.A. (2012). Apoptosis and apoptotic mimicry in Leishmania: an evolutionary perspective. Front Cell Infect Microbiol 12: 92-96. Review.

Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch S.C., Warner M.L., Henson, P.M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: 551–562.

Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A., Henson PM. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85-90.

Fairn G.D., Schieber N.L., Ariotti N. (2011). High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. J Cell Biol 194: 257–275

Ferguson D.J.P. (2009). Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii* : Small science, large characters. Int J Parasitol.

Ferguson D.J.P. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104:133-148.

Ferreira-da-Silva M.F., Barbosa H.S., Gross U., Lüder C.G. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. Mol Biosyst 4: 824-834. Review.

Ferreira-da-Silva M.F., Rodrigues R.M., Andrade E.F., Carvalho L., Gross U., Lüder C.G., Barbosa H.S. (2009a). 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., Takács A.C., Barbosa H.S., Gross U., Lüder C.G.K. (2009b). Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. International J Med Microbiol 299: 381-388.

Folch J. (1941). Isolation of phosphatidylserine from brain cephalin, and identification of the serine component. J Biol Chem 139: 973-974.

Frenkel J.K. (1990). Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc 196: 233-240.

Gherardi R., Baudrimont M., Lionnet F., Salord J.M., Duvivier C., Michon C., Wolff M., Marche C. (1992). Skeletal muscle toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study. Ann Neurol 32: 535-542.

Gomes A.F., Guimarães, 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.

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- γ and PGE2. Parasit Vect 7: 47-60.

Gross U., Pohl F. (1996). Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol 219: 235-245. Review.

Guimarães E.V., Acquarone M., Carvalho L., Barbosa H.S. (2007). Anionic Sites on *Toxoplasma gondii* Tissue Cyst Wall: Expression, Uptake and Characterization. Micron (Oxford) 38: 651-658.

Guimarães E.V., Acquarone, M., Carvalho, L., Barbosa H.S. (2010). Detection of fibronectin and laminin in *Toxoplasma gondii* tissue cysts: immunocytochemical assays. Scientia Medica (Porto Alegre) 20: 83-87

- Guimarães 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., Carvalho L., Barbosa H.S. (2008). Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. J Parasitol 94: 72-83.
- Halonen S.K., Weiss L.M. Toxoplasmosis. (2013). Handb Clin Neurol 114: 125-145.
- Heintzelman M.B. (2006). Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. Intl Rev Cytol 251: 79-129.
- Henson P.M., Bratton D.L., Fadok V.A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? Nat Rev Mol Cell Biol 2: 627-633.
- Hassene A., Vital A., Anghel A., Guez S., Series C. (2008). Acute acquired toxoplasmosis presenting as polymyositis and chorioretinitis in immunocompetent patient. Joint Bone Spine 75: 603-605.
- Hoff E.F., Carruthers V.B. (2002). Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? Trends Parasitol 18: 251-255. Review.
- Hoff R.L., Dubey J.P., Behbehani A.M., Frenkel J.K. (1977). *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. J Parasitol. 63:1121-1124.
- Howe D.K., Sibley L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis 172: 1561-1566.
- Hutchison W.M, Dunachie J.F, Work K., Siim J.C. (1971). The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. Trans R Soc Trop Med Hyg 65: 380-399.
- Inestrosa N.C. (1989). Differentiation of skeletal muscle cells in culture. Cell Struct Funct 28: 55-105.
- Jewett T.J., Sibley L.D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. Mol Cell 11: 885-894.
- Jacobs L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. (1967). Adv Parasitol 5: 1-45.
- Jones J.L., Dubey J.P. (2012). Foodborne Toxoplasmosis. Clin Infect Dis 55: 845-851.
- Jones J.L., Dubey J.P. (2012). Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis 55: 845-851. Review.

Jones T.C., Bienz K.A., Erb P. (1986). *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect Immun* 51: 147-156.

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.

Kassar-Duchossoy L., Gayraud-Morel B., Gomes D., Rocancourt D., Buckingham M., Shinin V., Tajbakhsh S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431: 466–471.

Kawazoe U. (2005). *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. 11^a ed., São Paulo: Atheneu 428.

Kay J.G., Grinstein S. (2013) Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. *Adv Exp Med Biol* 991: 177-193. Review.

Kay J.G., Koivusalo M., Ma X., Wohland T., Grinstein S. (2012). Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol Biol Cell* 23: 2198–2212.

Kim K., Weiss L.M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34: 423-432. Review.

Konigsberg I.R., Sollmann P.A., Mixer L.O. (1978). The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol* 63:11-26.

Konigsberg I.R. (1963). Clonal analysis of myogenesis. *Science*. 140:1273-84.

Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., Van Oers M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415–1420.

Kravetz J. (2013). Congenital toxoplasmosis. *Clin Evid (On line)*.

Kuypers F.A., Larkin S.K., Emeis J.J., Allison A.C. (2007). Interaction of an annexin V homodimer (Diannexin) with phosphatidylserine on cell surfaces and consequent antithrombotic activity. *Thromb Haemost* 97: 478-86.

Laliberté J., Carruthers V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* 65: 1900-1915.

Lane A., Soete M., Dubremetz J.F., Smith J.E. (1996) *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro. *Parasitol Res* 82: 340-346.

Lebrun M., Michelin A., El Hajj H., Poncet J., Bradley P.J., Vial H., Dubremetz J.F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol* 7: 1823-1833.

Lemgruber L., Lupetti P., Martins-Duarte E.S., De Souza W. Vommaro R.C. (2011). The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. *Cell Microbiol* 13: 1920-1932.

Leventis P.A., Grinstein S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39: 407-427.

Lindsay D.S., Dubey J.P., Blagburn B.L., Toivio-Kinnucan M. (1991). Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol* 77: 126-32.

Lindsay D.S., Toivio-Kinnucan M.A., Blagburn B.L. (1993). Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J Parasitol* 79: 289-292.

Linkhart T.A., Clegg C.H., Hauschika 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.

Loose D., Van De Wiele C. (2009). The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 24: 369-376.

MacLaren A., Attias M., de Souza W. (2004). Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Vet Parasitol* 10: 301-312.

McGovern K.E., Wilson E.H. (2013). Dark side illuminated: imaging of *Toxoplasma gondii* through the decades. *Parasit Vect* 6: 334-342.

McHugh T.D., Gbewonyo A., Johnson J.D., Holliman R.E., Butcher P.D. (1993). Development of an in vitro model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Lett* 114: 325-332.

Mehlhorn H., Frenkel J.K. (1980). Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol* 66: 59-67.

Melo E.J.T., De Souza W. (1997). Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct Funct* 22: 317-323.

Mercier C., Adjogble K.D., Daubener W., Delauw M.F. (2005). Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* 35: 829-849.

Mercier C., Dubremetz J.F., Rauscher B., Lecordier 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.

Ming M., Ewen, M.E., Pereira, M.E. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell* 82 287-296.

Montoya J.G., Liesenfeld O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*. 363: 1965-1976. Review.

Moreira M.E., Del Portillo H.A., Milder R.V., Balanco J.M., Barcinski M.A. (1996). Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* 167: 305-313.

Moreira M.E, Barcinski, M.A. (2004). Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Cienc* 76: 93-115.

Moncaut N., Rigby P.W, Carvajal J.J. (2013). Dial M(RF) for myogenesis. *FEBS J*. 280: 3980-3990.

Moudy R., Manning T.J., Beckers C.J. (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 276: 41492-41501.

Mordue D.G., Hakansson S., Niesman I., Sibley L.D. (1999). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 92: 87-99.

Monteiro V.G., de Melo E.J., Attias M., de Souza W. (2001). Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. *J Struct Biol* 136: 181-189.

Moreno S.N., Zhong L. (1996). Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem J* 313 : 655-659.

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.

Mueller C., Klages N., Jacot D., Santos J.M., Cabrera A., Gilberger T.W., Dubremetz J.F., Soldati-Favre D. (2013). The *Toxoplasma* protein ARO mediates the apical positioning of rhoptry organelles, a prerequisite for host cell invasion. *Cell Host Microbe* 13: 289-301.

Muno R.M., Carvalho I.C., Seabra S.H. Barbosa H.S. (2014). Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*. Folia Parasitol (Praha) 104: 862-864.

Nicolle, C. Manceaux, L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C R Acad Sci 147:736.

Okada T., Marmansari D., Li Z.M., Adilbish A., Canko S., Ueno A., Shono H., Furuoka H., Igarashi M. (2013). A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 189: 5-13.

Pacheco-Soares C., De Souza W. (1998). Redistribution of parasite and host cell membrane components during *Toxoplasma gondii* invasion. Cell Struct Funct. 23: 159-168.

Paredes-Santos T.C., Martins-Duarte E.S., Vitor R.W., de Souza W., Attias M., Vommaro R.C. (2013). Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Int. 62:181-188.

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.

Pourquié O. (2003). The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. Science. 301: 328-330. Review.

Pownall M.E., Gustafsson M.K., Emerson C.P. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors invertebrate embryos. Annu Rev Cell Dev Biol 18: 747-783.Review.

Remington J.S., Cavanaugh E.N. (1965). Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. N Engl J Med 273: 1308-1310.

Ricard J., Pelloux H., Gross U., Meunier A., Ambroise-Thomas P. (1999). Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor. J Parasitol 85: 583-585.

SABIN A.B. (1939). Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. Proceedings of the Society for Exp Biol Med 41: 75-80.

Sanger J.W., Kang S., Siebrands C.C., Freeman N., Du A., Wang J., Stout A.L., Sanger J.M. (2006). How to build a myofibril. J Muscle Res Cell Motil 26: 343-354.

Seabra S.H., DaMatta R.A., de Mello F.G., de Souza W. (2004). Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 90: 455–460.

Seabra S.H., de Souza W., DaMatta R.A. (2004). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 744-752.

Sethi K.K., Rahman A., Pelster B., Brandis H. (1977). Search for the presence of lectin-binding sites on *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 63: 1076-1080.

Shainberg A., Yagil G., Yaffe D. (1969). Control of myogenesis *in vitro* by Ca^{++} concentration in nutritional medium. *Exptl Cell Res* 58: 163-167.

Shen D., Sibley L.D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol* 15: 449–455.

Sibley L.D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304: 248-253. Review.

Sibley L.D., Håkansson S., Carruthers V.B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol* 8: R12–R14.

Sibley L.D., Niesman I.R., Parmley S.F, Cesbron-Delauw M.F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci* 108: 1667-1677.

Sibley L.D., Weidner E., Krahenbuhl J.L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315: 4416-4419.

Sinai A.P. (2008). Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem* 47: 155-64. Review.

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.

Skariah S., McIntyre M.K., Mordue D.G. (2010). *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 107: 253-260.

Soète M., Camus D., Dubremetz J.F. (1994). Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp Parasitol* 78: 361-370.

Soète M., Dubremetz J.F. (1996). *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219: 76-80. Review.

Soète M., Fortier B., Camus D., Dubremetz J.F. (1993) *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp Parasitol* 76: 259-264.

Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoários parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda em molti punti il dell'uoma Kala-azar. Nota preliminare. *Rev Soc Sci São Paulo* 3: 109-112.

Summerbell D., Halai C., Rigby P.W.J. (2002). Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somitic bud. *Mech Dev* 117: 331–335.

Tajbakhsh S., Rocancourt D., Cossu G., Buckingham M. (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 anesis and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89: 127–138

Takács A.C., Swierzy I.J., Lüder C.G. (2012). Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. *PLoS One* 7: e45440.

Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258. Review.

Torchinsky M.B., Garaude J., Blander J.M. (2010). Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. *Curr Opin Immunol* 22: 55–62.

Vance J.E., Steenbergen R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 44: 207–234.

Vance J.E. (2013). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1841: 595-609.

Vance, J.E., Tasseva G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1831: 543-554.

Vance J.E. (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res* 49: 1377-1387.

Van den Eijnde S.M. (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci* 114: 3631-3642.

Wanderley J.L., Barcinski M.A. (2010). Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cell Mol Life Sci* 67:1653-1659. Review.

Wanderley J.L., da Silva L.H.P., Deolindo P., Soong L., Borges V.M., Prates D.B., de Souza A.P., Barral A., Balanco J.M., do Nascimento M.T., Saraiva E.M., Barcinski M.A. (2009). Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. *PLoS One* 4: e5733.

Wanderley J.L., Moreira M.E.C., Benjamin A., Bonomo A.C., Barcinski M.A. (2006). Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 176: 1834-1839.

Wang T., Liu M., Gao X.J., Zhao Z.J., Chen X.G., Lun Z.R. (2011). *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Exp Parasitol* 127:107-112.

Welburn S.C., Dale C., Ellis D., Beecroft R., Pearson T.W. (1996). Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* *in vitro*. *Cell Death Differ* 3:229-236.

Weiss L.M, Kim K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 5: D391-405.

Yaffe D., Saxel O. (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* 7: 159-166.

Yaffe D. (1973). Rat skeletal muscle cells. In: Kruse Jr PF, Patterson Jr MK, editors. *Tissue culture: methods and applications*. New York: Ac. Press. p. 106-114.

Yaffe D. (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 61: 477-483.

Zhang Y.W., Halonen S.K., Ma Y.F., Wittner M., Weiss L.M. (2001). Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun* 69: 501-507.

Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 62: 971–988.