

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E DE ALGUMAS DE
SUAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E
EPITELIAIS RENAIS DURANTE A CISTOGÊNESE DE *TOXOPLASMA GONDII***

por

MARIANA COIMBRA GARCIA

Rio de Janeiro
Março de 2016

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E DE ALGUMAS DE
SUAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E
EPITELIAIS RENAIIS DURANTE A CISTOGÊNESE DE *TOXOPLASMA GONDII***

por

MARIANA COIMBRA GARCIA

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

Orientadora: Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
Março de 2016

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

G216 Garcia, Mariana Coimbra

Avaliação estrutural de proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas em células musculares esqueléticas e epiteliais renais durante a cistogênese de *Toxoplasma gondii* / Mariana Coimbra Garcia. – Rio de Janeiro, 2016.

xvi, 168 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 140-152

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Cistogênese. 3. Proteínas. 4. Citoesqueleto. I. Título.

CDD 616.936

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Em dissertação intitulada:

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E DE ALGUMAS DE
SUAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E
EPITELIAIS RENAIIS DURANTE A CISTOGÊNESE DE *TOXOPLASMA GONDII***

Apresentada por:

MARIANA COIMBRA GARCIA

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Katia da Silva Calabrese - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - Revisora e presidente

Dra. Lais de Carvalho - Instituto de Biologia - UERJ - Membro

Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - Membro

SUPLENTE:

Dra. Andrea Henriques Pons - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Dr. Renato Augusto DaMatta - Programa de Biociências e Biotecnologia - UENF

Rio de Janeiro, 31 de março de 2016

Aprovada em 31/03/2016

AGRADECIMENTOS

Esta etapa precisava ser cumprida, de uma forma ou de outra. Não foi fácil chegar até aqui e eu não conseguiria avançar nem a metade do caminho se não fosse pela ajuda e incentivo de muitas pessoas, algumas delas não mais presentes rotineiramente na minha vida ou mesmo neste plano. A todos vocês que me disseram “não desista”, meu mais profundo agradecimento.

Agradeço demais à minha mãe, Maria do Rosário Coimbra, por atravessar todos os obstáculos deste percurso comigo. Obrigada por me conceder a oportunidade de estudar e de não interferir nas minhas escolhas de vida.

Darlan de Azevedo, meu melhor amigo e namorado: obrigada por ter dito que eu não podia passar o resto da vida me lamentando e por ter me incentivado a enviar aquele e-mail. Foram seu apoio e crença de que tudo ia dar certo que me impulsionaram a buscar uma nova oportunidade de fazer aquilo que mais gosto. Obrigada por acreditar que posso ser melhor e por aceitar percorrer esta vida ao meu lado.

À Dra. Helene Santos Barbosa, minha mais profunda gratidão. Obrigada por ter me aceitado como aluna. Serei eternamente grata à senhora por esta oportunidade. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar a ser melhor, sempre. Sou muito grata pela sua vida e pela sua saúde. Obrigada por tudo, de coração.

Agradeço ao Dr. Erick Vaz Guimarães por toda a sua ajuda durante este mestrado tão turbulento. Obrigada por todas as dicas, conselhos, auxílio desmedido e disponibilidade em ajudar. Muito obrigada mesmo.

Um agradecimento especial à Dra. Renata de Muno pela generosidade em disponibilizar seu laboratório no Instituto de Pesquisas Biomédicas (Marinha do Brasil) para meu uso quando necessário.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Biologia Estrutural – LBE (pesquisadores, alunos e técnicos) por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho.

Às minhas queridas Barbara, Liandra e Natassia, meu muito obrigada. Esse trabalho teve muita ajuda de vocês, cada uma contribuindo à sua maneira. Obrigada por tornarem meus dias no LBE bem mais divertidos! Agradeço muito a vocês pela lealdade e amizade.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao IOC pelas bolsas concedidas durante o período do mestrado.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro das seguintes entidades: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio Estratégico à Pesquisa (PAPES VI-Fiocruz), CNPq e IOC.

“A ignorância gera confiança mais frequentemente do que o conhecimento.”

Charles Darwin

RESUMO

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar todas as células nucleadas de seus hospedeiros. A formação de cistos de *T. gondii* ocorre durante a fase crônica da doença. Estes cistos podem se romper para a formação de novos cistos, permitindo a manutenção do parasitismo, preferencialmente nos tecidos muscular esquelético e neural que, como células diferenciadas, seriam os nichos de eleição do parasito para o estabelecimento da cistogênese. Dessa forma, a utilização da célula muscular esquelética, como modelo celular, mimetiza o processo de diferenciação do parasito, como no sistema *in vivo*. No entanto, diferentes linhagens de célula epitelial renal têm se mostrado com intensa cistogênese espontânea. Este trabalho visa explorar o comportamento do citoesqueleto da célula hospedeira, durante a cistogênese de *T. gondii*, avaliando a distribuição de proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas, como a miosina e a plectina, em células musculares esqueléticas (CME - linhagem C2C12) e epiteliais renais (linhagem Vero), *in vitro*. Para a otimização do modelo músculo foram testados protocolos de diferenciação celular, a fim de obter culturas ricas em miotubos/miofibras. Após analisar diferentes densidades celulares, concentração de cálcio e insulina, foi estabelecida para uma área de crescimento com 132 mm² a densidade de 7,5 x 10⁴ células na presença de 10 mM de CaCl₂ e 100UI/ml de insulina humana como o protocolo de escolha. A análise morfológica das proteínas do citoesqueleto nas CME durante a cistogênese demonstrou reestruturação dos microtúbulos circundando o cisto em células mononucleadas, mas não em miotubo/miofibra e um rearranjo discreto da plectina ao redor do cisto. A desmina, proteína formadora do principal filamento intermediário deste tipo celular, apresentou dois padrões de distribuição em células contendo cistos: concentração da proteína nas extremidades e/ou na periferia celular de miotubos e sem alteração na organização estrutural dos filamentos em miofibras. Nenhuma modificação pode ser notada na disposição da miosina e da F-actina em CME. Com relação às proteínas do citoesqueleto da célula epitelial, houve remodelamento dos microtúbulos e reestruturação dos filamentos de citoqueratina, principal filamento intermediário da célula epitelial, no entrono da estrutura cística. Contudo, nenhuma alteração pode ser detectadas na distribuição da F-actina. Estabelecemos neste trabalho um protocolo para produção e purificação de formas infectantes de *T. gondii* da cepa ME-49, em linhagem celular Vero, validado por análises quantitativas e ultraestruturais. A geração espontânea de cistos em larga escala em células Vero as aponta como uma metodologia alternativa à de animais experimentais. As alterações na organização de algumas proteínas do citoesqueleto, detectadas em ambos os modelos celulares analisados, enquanto outras permaneceram inalteradas, revela a complexidade da interação do parasito e sua célula hospedeira, que garante o sucesso do parasitismo durante a fase crônica da infecção.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, cistogênese, proteínas, citoesqueleto.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, etiologic agent of toxoplasmosis, is an obligate intracellular protozoan capable of infecting all nucleated cells of their hosts. *T. gondii* cysts formation occurs during the chronic phase of disease. These cysts may rupture to form new cysts allowing the maintenance of parasitism, preferably in skeletal muscle and neural tissues, such as differentiated cells, would be elected niches for the establishment of cystogenesis. Thus, use of skeletal muscle cells like cell model mimics parasite differentiation process, such *in vivo* system. However, different lineages of kidney epithelial cells have been shown intense spontaneous cystogenesis. This work aims to explore cytoskeleton behavior of the host cell during cystogenesis of *T. gondii*, evaluating the distribution of cytoskeletal proteins and some of its associated proteins, as myosin and plectin, in skeletal muscle cells (CME - C2C12 lineage) and renal epithelial (Vero lineage), *in vitro*. To optimize muscle cell differentiation in order to obtain rich crops myotubes/myofibers we tested protocols. After analyzing different cell densities, concentration of calcium and insulin in a growth area of 132 mm², 7.5 x 10⁴ cells density was established in the presence of 10 mM CaCl₂ and 100 IU/ml human insulin as protocol of choice. Morphological analysis of cytoskeletal proteins in CME during cystogenesis shown reorganization of microtubules surrounding cyst in mononuclear cells, but not in myotube/myofibers and a slight rearrangement of plectin around cyst. Desmin, main filament-forming protein of intermediate type in CME, presented two distribution patterns in cells containing cysts: protein concentration at the ends and/or cell periphery in myotubes and without altering structural organization of filaments in myofibers. No modifications can be noted in myosin and F-actin arrangement of CME. Regarding epithelial cell cytoskeleton proteins, we noted remodeling of microtubules and restructuring of cytokeratin filament, main intermediate filament-forming protein of epithelial cells, around cystic structure. However, no changes could be detected in distribution of F-actin. We established in this work a protocol for production and purification of infective forms of *T. gondii* of the ME-49 strain in Vero cell line, validated by quantitative and ultrastructural analysis. Spontaneous large-scale generation of cysts in Vero cells show an alternative method to use of experimental animals. Changes in the organization of some cytoskeletal proteins detected in both cell models analyzed, while others remained unchanged, reveals a complex interaction of parasite and its host cell, which ensures success of parasitism during chronic phase of infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, cystogenesis, protein, cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

| | |
|---|----|
| Figura 1.1: Ultraestrutura dos principais estágios infectivos de <i>T. gondii</i> | 2 |
| Figura 1.2: Ciclo biológico de <i>T. gondii</i> | 7 |
| Figura 1.3: Processo de diferenciação da célula muscular esquelética | 10 |
| Figura 1.4: Esquema simplificado de um sarcômero..... | 13 |
| Figura 1.5: Papel da plectina em fibras musculares esqueléticas..... | 15 |
| Figura 1.6: A junção móvel é formada durante a invasão da célula hospedeira pelo <i>T. gondii</i> | 18 |
| Figura 5.1: Influência da densidade celular na diferenciação de mioblastos da linhagem celular C2C12 | 37 |
| Figura 5.2: Morfologia celular do processo de miogênese em diferentes densidades celulares por microscopia de fluorescência..... | 38 |
| Figura 5.3: A concentração de cálcio no meio de cultura modula positivamente a formação de miotubos em C2C12..... | 40 |
| Figura 5.4: Microscopia de fluorescência dos aspectos morfológicos das culturas de C2C12 induzidas à diferenciação a partir de diferentes concentrações de cálcio no meio de cultura..... | 41 |
| Figura 5.5: Atuação da insulina sobre a miogênese de células da linhagem celular C2C12 | 43 |
| Figura 5.6: Estágio mais avançado de diferenciação celular da linhagem C2C12 | 43 |
| Figura 5.7: Análise estrutural das culturas de C2C12 não-tratadas com insulina | 44 |
| Figura 5.8: Distribuição dos filamentos de actina em células mononucleadas sem infecção da linhagem C2C12 | 46 |
| Figura 5.9: Organização estrutural dos microfilamentos de actina em miotubos da linhagem C2C12 sem infecção..... | 47 |
| Figura 5.10: A análise do impacto da presença do cisto de <i>T. gondii</i> sobre os microfilamentos de actina de um miotubo | 48 |
| Figura 5.11: Distribuição da β -tubulina em mioblastos sem infecção da linhagem celular C2C12..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.12: Organização dos microtúbulos em miotubo e miócito da linhagem celular C2C12 sem infecção..... | 51 |
| Figura 5.13: Reorganização da tubulina ao redor de um cisto de <i>T. gondii</i> no interior de um mioblasto (C12C12)..... | 52 |
| Figura 5.14: Remodelamento da proteína tubulina ao redor de um cisto de <i>T. gondii</i> no interior de um mioblasto (C2C12)..... | 53 |
| Figura 5.15: Remodelamento dos microtúbulos em miofibra de C2C12 apresentando um cisto de <i>T. gondii</i> | 54 |
| Figura 5.16: Organização dos microtúbulos em miofibra contendo um cisto de <i>T. gondii</i> | 55 |
| Figura 5.17: Filamentos de desmina em mioblastos sem infecção da linhagem celular C2C12..... | 57 |
| Figura 5.18: Distribuição dos filamentos de desmina em miócitos sem infecção da linhagem celular C2C12..... | 58 |
| Figura 5.19: Organização dos filamentos de desmina em miotubos da linhagem celular C2C12..... | 59 |
| Figura 5.20: Padrões de disposição da desmina em miotubo e miofibra de C2C12..... | 60 |
| Figura 5.21: Remodelamento dos filamentos de desmina de C2C12 em miotubo apresentando um cisto de <i>T. gondii</i> | 61 |
| Figura 5.22: Alteração da distribuição da desmina de C2C12 em miotubo apresentando um cisto de <i>T. gondii</i> | 62 |
| Figura 5.23: Disposição dos filamentos de desmina de C2C12 em miofibra apresentando um cisto de <i>T. gondii</i> | 63 |
| Figura 5.24: Filamentos de desmina de C2C12 em miofibra apresentado dois cistos de <i>T. gondii</i> | 64 |
| Figura 5.25: Filamentos de desmina de C2C12 em miofibra apresentado um cisto de <i>T. gondii</i> | 65 |
| Figura 5.26: Organização da miosina de C2C12 em células mononucleadas sem infecção..... | 67 |
| Figura 5.27: Organização da miosina de C2C12 em miotubos sem infecção..... | 68 |
| Figura 5.28: Padrão de distribuição da miosina em C2C12 na contendo um cisto de <i>T. gondii</i> | 69 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.29: Revelação de miosina em C2C12 mononucleada contendo um cisto de <i>T. gondii</i> | 70 |
| Figura 5.30: Revelação de miosina em C2C12 mononucleadas contendo VP de <i>T. gondii</i> | 71 |
| Figura 5.31: Padrão de distribuição da plectina em células C2C12 não infectadas.. | 73 |
| Figura 5.32: Redistribuição da plectina de C2C12 | 74 |
| Figura 5.33: Revelação de plectina ao redor do VP de <i>T. gondii</i> em processo de transição para cisto no interior da C2C12 | 75 |
| Figura 5.34: Reorganização da plectina da C2C12..... | 76 |
| Figura 5.35: Distribuição da plectina em C2C12 mononucleadas contendo VP em transição e cistos de <i>T. gondii</i> | 77 |
| Figura 5.36: Reorganização da plectina de C2C12 quando há infecção pelo <i>T. gondii</i> | 78 |
| Figura 5.37: Reestruturação da plectina de C2C12 ao redor de dois cistos de <i>T. gondii</i> | 79 |
| Figura 5.38: Organização estrutural dos microfilamentos de actina na célula epitelial renal Vero sem infecção..... | 81 |
| Figura 5.39: Distribuição dos filamentos de actina na célula Vero infectada..... | 82 |
| Figura 5.40: VP de <i>T. gondii</i> em transição no interior de uma célula Vero..... | 83 |
| Figura 5.41: Perfil de distribuição dos microfilamentos de actina da célula Vero infectada..... | 84 |
| Figura 5.42: Marcação para filamentos de actina no cisto de <i>T. gondii</i> no interior da célula Vero | 85 |
| Figura 5.43: Perfil de distribuição dos filamentos de actina da célula Vero e marcação para F-actina no cisto de <i>T. gondii</i> | 86 |
| Figura 5.44: Organização estrutural dos microtúbulos na célula Vero não infectada | 88 |
| Figura 5.45: Disposição dos microtúbulos na célula Vero contendo VP de <i>T. gondii</i> | 89 |
| Figura 5.46: Disposição dos microtúbulos nas células Vero contendo VP em transição de <i>T. gondii</i> | 90 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.47: Reorganização dos microtúbulos das células Vero ao redor do cisto de <i>T. gondii</i> | 91 |
| Figura 5.48: Remodelamento dos microtúbulos da célula Vero na periferia de um cisto de <i>T. gondii</i> | 92 |
| Figura 5.49: Distribuição dos microtúbulos em célula Vero alterada na presença de cisto de <i>T. gondii</i> | 93 |
| Figura 5.50: Perfil de distribuição dos filamentos de citoqueratina na célula epitelial renal Vero não infectada | 95 |
| Figura 5.51: Organização dos filamentos de citoqueratina na célula epitelial renal Vero infectada com <i>T. gondii</i> | 96 |
| Figura 5.52: Alteração do perfil dos filamentos de citoqueratina dispostos ao redor de VP de <i>T. gondii</i> em transição em células Vero..... | 97 |
| Figura 5.53: Remodelamento dos filamentos de citoqueratina na célula Vero na presença do VP de <i>T. gondii</i> em transição..... | 98 |
| Figura 5.54: Rearranjo dos filamentos de citoqueratina da célula Vero ao redor de um cisto e de um VP de <i>T. gondii</i> em transição | 99 |
| Figura 5.55: Remodelamento da citoqueratina ao redor de um cisto de <i>T. gondii</i> na célula Vero | 100 |
| Quadro 5.1: Compilação dos resultados obtidos a partir da análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas na CME e célula epitelial renal durante a cistogênese de <i>T. gondii</i> | 101 |
| Figura 6.1: Produção de cistos de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49 em células Vero | 106 |
| Figura 6.2: Morfologia das culturas de células Vero infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49 | 107 |
| Figura 6.3: Análise estrutural das formas de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49 produzidas em células Vero..... | 109 |
| Figura 6.4: Ultraestrutura da célula Vero não infectada | 111 |
| Figura 6.5: Ultraestrutura de células Vero recém-infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> | 112 |
| Figura 6.6: Ultraestrutura de células Vero infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> contendo parasitos em estágio-conversão..... | 114 |

| | |
|---|-----|
| Figura 6.7: Ultraestrutura de células Vero multi-infectadas por <i>T. gondii</i> em diferentes etapas de desenvolvimento..... | 115 |
| Figura 6.8: Ultraestrutura de células Vero contendo cistos de <i>T. gondii</i> no início de sua formação..... | 117 |
| Figura 6.9: Ultraestrutura de células Vero contendo cistos de <i>T. gondii</i> em estágio avançado de desenvolvimento | 118 |
| Figura 6.10: Ultraestrutura da célula Vero contendo cisto de <i>T. gondii</i> bem desenvolvido | 119 |
| Figura 6.11: Ultraestrutura de células Vero contendo cistos maduros de <i>T. gondii</i> . | 120 |
| Figura 6.12: Ultraestrutura de um cisto maduro de <i>T. gondii</i> no interior da uma célula Vero..... | 121 |

LISTA DE ABREVIATURAS

4',6-diamino-2-fenilindol = DAPI
Ácido etilenodiamino tetra-acético = EDTA
Albumina de soro bovino = BSA
Célula muscular esquelética = CME
Difosfato de adenosina = ADP
Glicosilfosfatidilinositol = GPI
Imunoglobulina = Ig
Interferon gama = IFN- γ
Interleucina 12 = IL-12
Junção móvel = JM
Lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* = DBA
Lipoproteína de baixa densidade = LDL
Proteína associada ao microtúbulo = MAP
Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo a mistura de nutrientes de Ham (F12) = DMEM/F12
Membrana do vacúolo parasitóforo = MVP
Microscopia eletrônica de transmissão = MET
N-acetil-galactosamina = GalNAc
Paraformaldeído = PFA
Parede cística = PC
Potencial hidrogeniônico = pH
Prostaglandina E2 = PGE2
Rede túbulo vesicular = RTV
Retículo endoplasmático liso = REL
Retículo endoplasmático rugoso = RER
Salina tamponada com fosfato = PBS
Soro de cavalo = SC
Soro fetal bovino = SFB
Trifosfato de adenosina = ATP
Vacúolo parasitóforo = VP

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| Resumo | vii |
| Abstract..... | viii |
| Lista de figuras e quadro..... | ix |
| Lista de abreviaturas | xiv |
| I. Introdução..... | 1 |
| 1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> | 1 |
| 1.1.1. Aspectos históricos | 1 |
| 1.1.2. Principais estágios infectivos e diversidade genotípica | 2 |
| 1.1.3. Ciclo biológico..... | 5 |
| 1.2. Toxoplasmose..... | 7 |
| 1.3. Células hospedeiras..... | 9 |
| 1.3.1. Célula muscular esquelética (CME)..... | 9 |
| 1.3.2. Célula epitelial renal Vero | 11 |
| 1.4. Aspectos gerais do citoesqueleto das células hospedeiras | 12 |
| 1.4.1. O citoesqueleto da CME | 12 |
| 1.4.2. O citoesqueleto da célula epitelial | 16 |
| 1.5. Aspectos gerais da interação de <i>T. gondii</i> e sua célula hospedeira..... | 17 |
| 1.5.1. Mecanismo de invasão da célula hospedeira por <i>T. gondii</i> | 17 |
| 1.5.2. Ciclo lítico e egresso da célula hospedeira..... | 19 |
| 1.5.3. Diferenciação taquizoíto-bradizoíto e formação de cistos teciduais | 20 |
| 1.5.4. CME como sítio de persistência de <i>T. gondii</i> | 22 |
| II. Justificativa..... | 25 |
| III. Objetivos | 27 |
| IV. Material e métodos | 28 |
| 4.1. Animais | 28 |
| 4.2. Cultivo e manutenção das células hospedeiras | 28 |
| 4.2.1. Linhagem celular muscular esquelética C2C12..... | 28 |
| 4.2.2. Linhagem celular epitelial renal Vero | 29 |
| 4.3. Obtenção de parasitos | 29 |
| 4.3.1. Bradizoítos | 29 |
| 4.3.2. Taquizoítos | 30 |
| 4.4. Padronização da miogênese e otimização da produção de miofibras em C2C12..... | 31 |
| 4.4.1. Variação na densidade celular..... | 31 |
| 4.4.2. Variação na concentração de cálcio | 31 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.3. Adição de insulina..... | 31 |
| 4.5. Análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto da CME durante a cistogênese de <i>T. gondii</i> | 33 |
| 4.6. Análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto da célula Vero durante a cistogênese de <i>T. gondii</i> | 34 |
| V. Resultados..... | 36 |
| 5.1. Aprimoramento da produção de miotubos/miofibras em culturas da linhagem celular C2C12 | 36 |
| 5.2. Análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas em CME durante a cistogênese de <i>T. gondii</i> | 45 |
| 5.3. Análise estrutural da distribuição das proteínas do citoesqueleto em células Vero durante a cistogênese de <i>T. gondii</i> | 80 |
| VI. Experimentos complementares | 102 |
| 6.1. Material e métodos..... | 102 |
| 6.1.1. Linhagem celular epitelial renal Vero (como descrito no item 4.2.2)..... | 102 |
| 6.1.2. Obtenção de bradizoítos a partir de camundongos cronicamente infectados com <i>T. gondii</i> (como descrito no item 4.3.1)..... | 102 |
| 6.1.3. Obtenção de taquizoítos a partir de culturas de células Vero infectadas com bradizoítos de <i>T. gondii</i> | 102 |
| 6.1.4. Quantificação da produção de cistos de <i>T. gondii</i> em células Vero..... | 103 |
| 6.1.5. Caracterização dos estágios evolutivos de <i>T. gondii</i> encontrados em células Vero | 103 |
| 6.1.6. Análise ultraestrutural dos taquizoítos e cistos de <i>T. gondii</i> produzidos em células Vero | 104 |
| 6.2. Resultados | 105 |
| 6.2.1. Produção de cistos de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49 em células Vero..... | 105 |
| 6.2.2. Análise por microscopia de fluorescência das formas evolutivas de <i>T.</i> <i>gondii</i> produzidas em células Vero | 108 |
| 6.2.3. Análise ultraestrutural das células Vero..... | 110 |
| 6.2.4. Análise ultraestrutural da interação de células Vero durante a infecção primária com formas taquizoítas de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49..... | 110 |
| VII. Discussão | 122 |
| VIII. Conclusões | 139 |
| IX. Referências bibliográficas | 140 |

I. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário parasito intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves. É responsável por uma das infecções parasitárias mais comuns no mundo. Pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse coccídeo, apresenta um complexo apical na região anterior do corpo, composto pelo anel polar, anéis pré-conoidais, microtúbulos intraconoidais, conóide e pelas organelas secretórias, róptrias e micronemas (revisto em de Souza *et al.*, 2010; Paredes-Santos *et al.*, 2012).

1.1.1. Aspectos históricos

T. gondii foi descrito simultaneamente por Splendore no Brasil e por Nicolle e Manceaux na Tunísia no ano de 1908 e identificado como um novo protozoário pelos mesmos autores em 1909. O grupo francês sugeriu a existência do gênero *Toxoplasma* (designação formada do grego “toxon”, que significa arco, e “plasma” que significa corpo), compreendendo as espécies *T. gondii* (aparentemente um erro de grafia, substituindo um “u” por um “o” no nome do roedor em que Nicolle e Manceaux encontraram o protozoário, o *Ctenodactylus gundi*) e *T. cuniculi* (espécie identificada por Splendore em coelhos). Mais tarde, foi verificado que se tratava de uma única espécie, prevalecendo a designação *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909; Splendore, 1909).

Nos anos seguintes (1908-1937) foi descrita a presença de *T. gondii* nos mais variados animais, incluindo o homem (Torres, 1927; Wolf e Cowen, 1937), e em diferentes regiões do mundo, o que identifica a toxoplasmose como a zoonose com maior distribuição cosmopolita. O ciclo de vida de *T. gondii* foi completamente desvendado quase simultaneamente por vários grupos, cerca de 60 anos após a descoberta do parasito (revisto em Dubey, 2009; Ferguson, 2009). Ainda hoje vários aspectos da biologia de *T. gondii* permanecem obscuros, demonstrando a alta complexidade deste parasito.

1.1.2. Principais estágios infectivos e diversidade genotípica

T. gondii pode se apresentar sob vários estágios evolutivos no curso de seu ciclo de vida, sendo três destas formas responsáveis pelo processo de transmissão da toxoplasmose: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Figura 1.1).

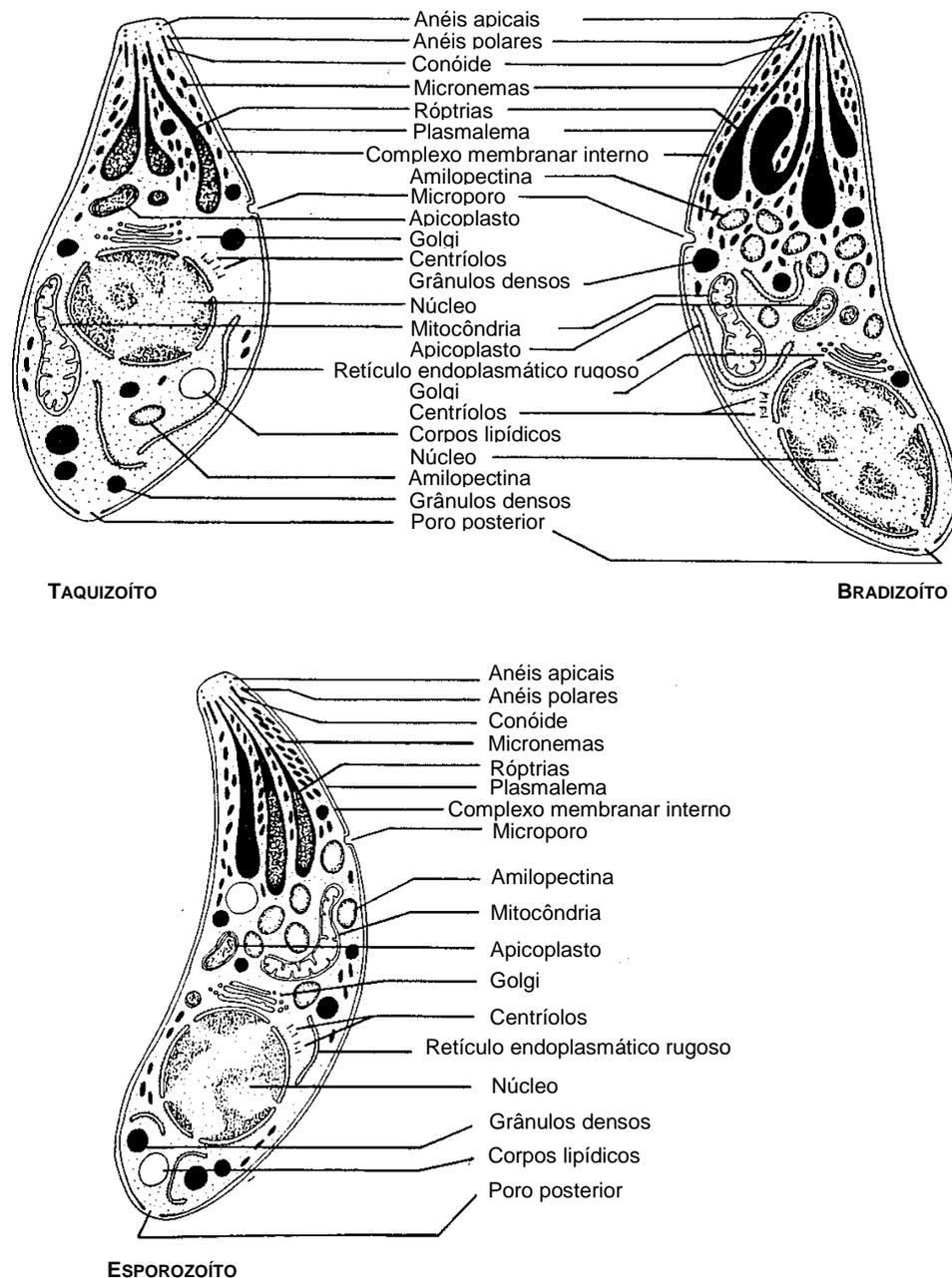


Figura 1.1: Ultraestrutura dos principais estágios infectivos de *T. gondii*. As diferenças morfológicas entre as formas evolutivas que se destacam são: a quantidade de grânulos de amilopectina e micronemas, a posição do núcleo e a morfologia das róptrias. Adaptado de Dubey *et al.* (1998)

O taquizoíto é capaz de infectar qualquer célula nucleada dos hospedeiros intermediários e definitivos, causando a fase aguda da toxoplasmose. Quando o taquizoíto invade a célula do hospedeiro, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo (VP), local onde se replica rapidamente (por isso é chamado de taquizoíto – “tachos” em grego significa rápido). Possui forma crescente de cerca de 6 μm de comprimento e 2 μm de largura, com a extremidade anterior mais afilada, onde é encontrado o conóide, e a extremidade posterior arredondada. A análise ultraestrutural de taquizoítos mostra a presença de várias organelas comuns aos eucariotos e algumas específicas dos Apicomplexas, sendo o núcleo normalmente situado no centro do corpo do parasito (Figura 1.1). Os taquizoítos multiplicam-se assexuadamente no interior da célula hospedeira por endodiogenia, uma forma especializada de reprodução em que duas células-filhas são geradas no interior da célula-mãe, que degenera ao final deste processo (Dubey *et al.*, 1998; revisto em Attias *et al.*, 2014).

O bradizoíto é a forma evolutiva com capacidade de multiplicação lenta (“bradi” em grego significa lento) encontrada no interior dos cistos teciduais presentes na fase crônica da toxoplasmose. Sua multiplicação (que também ocorre por endodiogenia) se dá inicialmente, no interior do VP e, posteriormente, após modificação da membrana deste vacúolo e formação da parede cística, no cisto tecidual. O cisto é uma estrutura resistente que pode ser encontrada em vários tecidos do hospedeiro, mas ocorre com maior incidência nos tecidos muscular esquelético e nervoso. Uma vez formado, o cisto tecidual protege os parasitos da resposta imune do hospedeiro e tem se mostrado resistente aos compostos farmacológicos de uso corrente no tratamento da toxoplasmose. Estabelecida a cistogênese, a infecção que pode perdurar por toda a vida do hospedeiro, caracterizando a toxoplasmose crônica. O bradizoíto apresenta forma crescente e cerca de 7 μm de comprimento e 1,5 μm de largura, núcleo situado na sua extremidade posterior, róptrias com conteúdo elétron-denso e muitos grânulos de amilopectina e micronemas (Figura 1.1) (Dubey *et al.*, 1998; revisto em Weiss e Kim, 2000).

Por fim, o esporozoíto é a forma evolutiva encontrada no interior do oocisto presente nas fezes dos hospedeiros definitivos de *T. gondii*, os felídeos. O esporozoíto, em termos de ultraestrutura, também apresenta forma crescente, grande número de micronemas, róptrias mistas (aspecto esponjoso e elétron-

densas) e poucos grânulos de amilopectina (Figura 1.1). Medem aproximadamente 6-8 µm de comprimento e 2 µm de largura (Dubey *et al.*, 1998).

As cepas de *T. gondii* são altamente diversificadas, mas apenas algumas linhagens são amplamente disponibilizadas. Variação nos genótipos do parasito mostram diferentes patogenicidades e sensibilidade à drogas. Numa revisão recente, Flegr *et al.* (2014) descreveram as cepas clonais como as mais empregadas na pesquisa. A clonalidade observada nestas cepas pode ser explicada pelas peculiaridades no complexo ciclo de vida deste parasito. A falta de obrigatoriedade do ciclo sexuado faz com que o parasito se reproduza indefinitivamente na natureza, sem passar pelo hospedeiro definitivo, e sofrer recombinação gênica, possibilitando o domínio de cepas clonais bem-sucedidas. Além disso, *T. gondii* é haploide, ou seja, um hospedeiro definitivo infectado com apenas uma cepa só produz oocistos geneticamente idênticos à cepa infectante parental. A recombinação só ocorreria se o hospedeiro definitivo se infectasse ao mesmo tempo com duas cepas com características genéticas distintas (Ferreira e Vitor, 2014).

As cepas clonais de *T. gondii*, obtidas majoritariamente dos Estados Unidos e Europa, foram agrupadas em três grandes linhagens distintas correlacionadas com o fenótipo de virulência em camundongos. Os principais critérios para a avaliação da virulência nestas cepas são a taxa de mortalidade e o tempo de sobrevivência destes animais quando infectados com inóculos diferenciais de taquizoítos. Assim, as cepas foram definidas em três grandes tipos: (i) virulentas (ou tipo I), como as cepas RH, CAST e GT-1; (ii) avirulentas (ou tipo II), como no caso das cepas ME-49, WIL e HART e ainda, de (iii) virulência intermediária (ou tipo III), abrangendo as cepas VEG, MOO e SOU (revisão em Saeij *et al.*, 2005 e Flegr *et al.*, 2014).

Taquizoítos das cepas do tipo I possuem menor capacidade de se converter a bradizoítos, e estão geralmente associadas com a toxoplasmose congênita e ocular em humanos. Cepas do tipo III diferenciam taquizoítos em bradizoítos rapidamente, levando ao estabelecimento da toxoplasmose crônica em seus hospedeiros. Porém, estas cepas são raramente associadas com doença clínica em seres humanos (Hunter e Sibley, 2012). Já as cepas do tipo II tendem a ser intermediárias aos tipos I e III em termos de competência de diferenciação e virulência, representando mais de 70% dos isolados em humanos. Não se sabe se estas cepas possuem maior prevalência ou se apresentam diferenças inerentes que ainda não foram

caracterizadas que as tornam mais propensas a reativar em hospedeiros humanos. Em sistemas *in vitro*, essas cepas diferenciam-se de taquizoíta para bradizoíta em altos índices e, portanto, são associadas com uma alta carga cística e com a fase crônica da infecção (Kim e Weiss, 2008). Apesar das significativas diferenças nos fenótipos, parece haver pouca diferença na sequência do genoma destas cepas (Croken *et al.*, 2014).

As cepas que apresentam genótipos atípicos diferem em prevalência, virulência, capacidade migratória no hospedeiro e capacidade de formação de cistos teciduais. Uma grande variedade de genótipos atípicos foi encontrada na América do Sul e África em comparação com a América do Norte e Europa, sugerindo que nestes continentes a replicação sexual do parasito ocorra com maior frequência do que em qualquer outra parte do mundo (Flegr *et al.*, 2014). A alta diversidade genética de *T. gondii* encontrada no Brasil tem sido demonstrada a partir de isolados de diversos animais, tais como galinhas (Dubey *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2016), gatos, cachorros (Pena *et al.*, 2008) e suínos destinados ao consumo humano (Frazão-Teixeira *et al.*, 2011).

1.1.3. Ciclo biológico

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

As principais vias de infecção pelo *T. gondii* nos seus hospedeiros são: i) ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas de animais cronicamente infectados; ii) ingestão direta de oocistos liberados das fezes de felinos infectados (transmissão fecal-oral), que pode ocorrer por meio do consumo de água, frutas e verduras mal lavadas ou, ainda, veiculados por insetos, aves e/ou pequenos roedores sinantrópicos e, iii) transplacentária, onde os taquizoítos presentes no sangue da mãe infectam o feto em desenvolvimento através da placenta (Figura 1.2). Outras vias de transmissão englobam transfusão de sangue,

transplante de órgãos, ingestão de qualquer tipo de leite e acidentes laboratoriais (revisto em Hill e Dubey, 2002; Tenter, 2009).

Uma vez que os cistos teciduais e oocistos são ingeridos, a parede do cisto e do oocisto é digerida pelas enzimas do trato gástrico e intestinal, o que ocasiona a liberação de bradizoítos e esporozoítos, respectivamente. Esses parasitos invadem as células da mucosa do tubo digestório e no interior destas células, alguns desses bradizoítos podem se replicar lentamente e outros podem se diferenciar em taquizoítos. Os taquizoítos seguem por duas vias de destino intracelular: (i) a via do ciclo lítico, onde proliferaram em altas taxas até que as células hospedeiras estejam repletas de parasitos, culminando com o seu egresso e liberação dos parasitos que infectarão células vizinhas até alcançarem a corrente sanguínea, disseminando a infecção por todo o corpo do hospedeiro e, (ii) a via da cistogênese, onde os taquizoítos que se originaram a partir de bradizoítos, podem, após uma série de multiplicações, se converterem em bradizoítos e formarem os cistos teciduais em um período de 5 a 12 dias após a infecção (revisto em Weiss e Kim, 2000).

Já a fase sexuada, ocorre exclusivamente nos felídeos. Bradizoítos e esporozoítos, oriundos dos cistos e oocistos rompidos no estômago do animal, penetram nas células epiteliais da superfície intestinal (enterócitos), onde ocorre a formação de diferentes esquizontes por reprodução assexuada, até a formação dos gametas femininos e masculinos (Dubey e Frenkel, 1972; Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009). Após a fecundação, forma-se o zigoto que é envolto por uma parede e passa a ser chamado de oocisto. Estes oocistos são liberados para o meio ambiente ainda imaturos, juntamente com as fezes dos felídeos (Figura 1.2). No ambiente, estes oocistos esporulam e se tornam infectantes. Cada oocisto maduro, na sua forma infectiva, contém 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada. O ciclo se fecha quando os oocistos são ingeridos pelos hospedeiros (intermediários ou definitivos) (revisto em Ferguson, 2009 e Barbosa *et al.*, 2014).

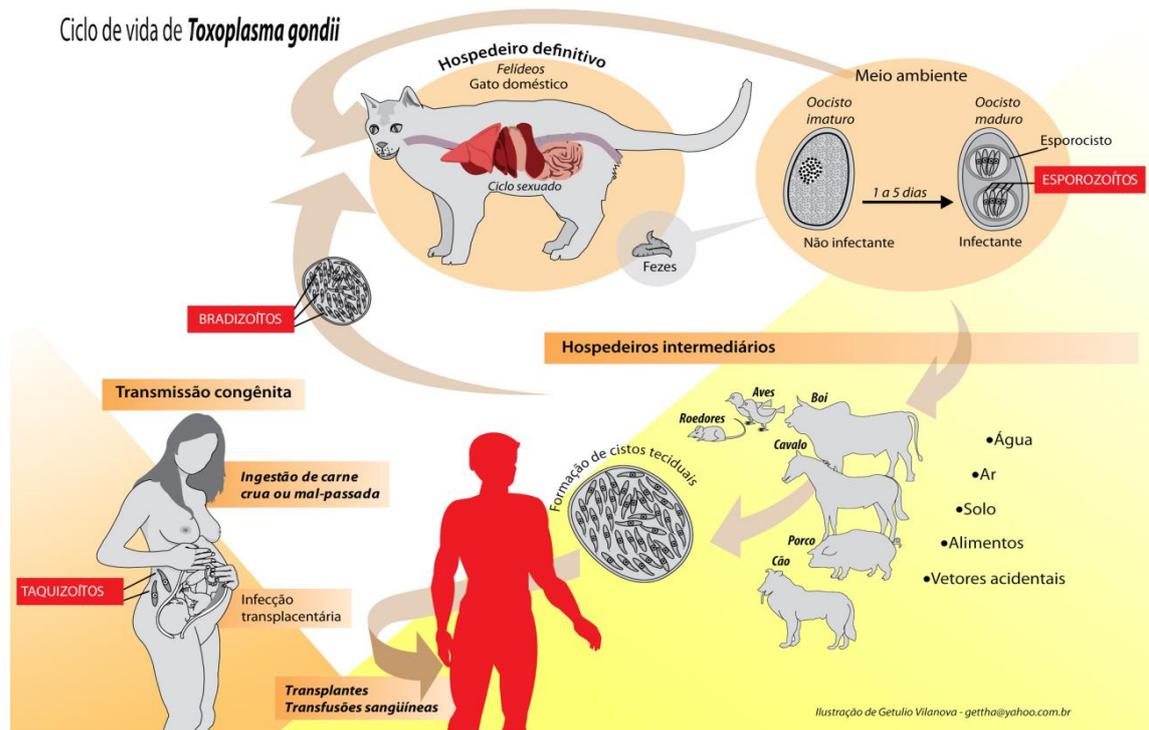


Figura 1.2: Ciclo biológico de *T. gondii*. A ilustração mostra as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários, representados pelas aves e mamíferos, incluindo o homem, e os hospedeiros definitivos, os felídeos. O ciclo compreende duas fases de reprodução: sexuada e assexuada. Fonte: Moura *et al.* (2009)

1.2. Toxoplasmose

T. gondii causa uma das zoonoses mais comuns em humanos e assume-se que aproximadamente 25 a 30% da população mundial esteja infectada. No entanto, as prevalências variam muito entre os países (10-80%) e, muitas vezes, dentro de um país ou entre diferentes comunidades na mesma região (Schlüter *et al.*, 2014). A prevalência da infecção é maior em climas quentes e úmidos, aumenta com a idade, não difere muito entre homens e mulheres, e, por fim, depende da qualidade dos recursos hídricos e dos hábitos de vida (higiênicos e alimentares) da população (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). No Brasil, a prevalência da toxoplasmose é de 56%, sendo ainda mais elevada na população de gestantes, 36-92% (Dubey *et al.*, 2012).

A fase aguda da infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes é assintomática ou gera sintomas inespecíficos. A infecção em gestantes pode levar

ao aborto ou natimorto, coriorretinite, hidrocefalia ou microcefalia e calcificações intracerebrais. Crianças infectadas que são saudáveis ao nascer podem desenvolver coriorretinite ao longo da vida. A toxoplasmose ocular não é necessariamente uma seqüela da infecção congênita, pois pode ser resultado de uma infecção pós-natal adquirida. Em hospedeiros imunocomprometidos, como receptores de órgãos transplantados, pessoas com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e pacientes com malignidades hematológicas ou recebendo terapia imunossupressora, a toxoplasmose pode se manifestar como uma encefalite potencialmente fatal, pneumonite e miocardite (Weiss e Dubey, 2009). A toxoplasmose nestes pacientes é geralmente uma consequência da recrudescência da infecção latente adquirida. A infecção por *T. gondii* também tem sido associada à doenças como a esquizofrenia e outras condições que envolvem mudanças de comportamento (Yolken *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2013).

O diagnóstico da toxoplasmose baseia-se principalmente em testes sorológicos. Uma variedade de testes tem sido desenvolvida para detectar diferentes classes de anticorpos ou antígenos, como o teste do corante (DT), de aglutinação modificada (MAT) e os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Liu *et al.*, 2015). O ELISA é considerado o padrão-ouro para a detecção de anticorpos específicos (IgG ou IgM) anti-*T. gondii* (Saadatnia e Golkar, 2012). Os métodos moleculares, baseados na detecção dos ácidos nucléicos do parasito, são utilizados de forma complementar aos métodos sorológicos convencionais. Embora os métodos convencionais sejam confiáveis, estes se restringem para uso no pré-natal visando detectar a infecção do feto ou em pacientes imunocomprometidos. No diagnóstico laboratorial, o método molecular mais difundido é a reação em cadeia da polimerase (PCR), convencional e em tempo real (Liu *et al.*, 2015).

O tratamento da toxoplasmose faz uso de drogas que atuam sobre o taquizoíto, ou seja, são eficazes apenas na forma aguda da doença. O padrão-ouro para o tratamento é a associação das drogas sulfadiazida e pirimetamina, onde ambas agem sobre o metabolismo dos folatos, nas enzimas di-hidropteroato sintetase e di-hidrofolato redutase, respectivamente (de Mendonça, 2014). A suplementação de ácido fólico normalmente é realizada para prevenir a supressão da medula óssea causada pela pirimetamina. A clindamicina é um antibiótico bacteriostático e uma opção alternativa quando sulfonamidas não podem ser utilizadas, enquanto a atovaquona (composto análogo a ubiquinona) é utilizada em pacientes que não

toleram sulfonamida ou clindamicina. Já a espiramicina, um antibiótico macrolídico, é recomendada para gestantes, pois atinge alta concentração na placenta (Halonen e Weiss, 2013). No entanto, não há nenhuma terapêutica conhecida capaz de impedir a produção de cistos ou eliminá-los.

1.3. Células hospedeiras

1.3.1. Célula muscular esquelética (CME)

As células precursoras musculares são derivadas dos somitos, os quais se originam do mesoderma, em resposta a fatores reguladores miogênicos que são críticos para a determinação e diferenciação terminal do músculo esquelético. Nos somitos, algumas células tornam-se pré-determinadas a se diferenciar em mioblastos e migram para tecido conjuntivo adjacente. Porém, o determinante para a diferenciação em mioblasto é a ativação de um ou mais genes miogênicos. A expressão de MyoD e Myf5 é uma etapa fundamental e resulta no comprometimento de células do somito em linhagens miogênicas, enquanto a miogenina desempenha importante papel na diferenciação inicial de mioblastos (miogênese). Durante a miogênese, os mioblastos saem do ciclo celular e tornam-se miócitos aptos à fusão. Os miócitos então se alinham e se fusionam até a formação dos miotubos/miofibras multinucleados (Figura 1.3) (Bentzinger *et al.*, 2012; Musumeci *et al.*, 2015).

Nas fibras musculares no indivíduo adulto, são as células satélites aquelas responsáveis pelo processo de regeneração do tecido. Elas representam uma população de células miogênicas que atuam no crescimento pós-natal do músculo esquelético, no reparo de danos e na manutenção do tecido, respeitando a mesma hierarquia que governa a miogênese embrionária (Moresi *et al.*, 2015).

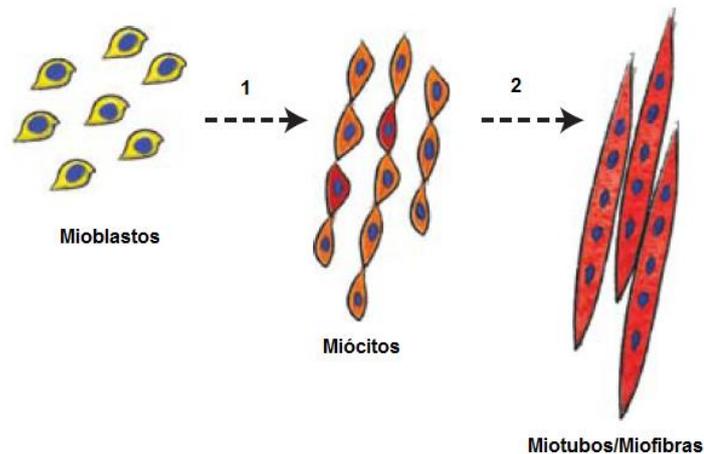


Figura 1.3: Processo de diferenciação da célula muscular esquelética. Esquema simplificado das alterações morfológicas da CME durante a miogênese, a partir de somitos ou células satélites. Durante a diferenciação inicial (1), os mioblastos tornam-se miócitos pela ação do fator de regulação miogênico miogenina. Na diferenciação terminal (2) os miócitos se alinham e se fusionam levando a formação de miofibras e miofibras. Adaptado de Bentzinger *et al.* (2012)

Konigsberg foi o pioneiro no cultivo primário de CME derivadas de pinto (1960 e 1963; revisto em Yaffe, 1973). As culturas primárias de tecidos embrionários foram obtidas a partir da dissociação mecânica, enzimática ou pela conjugação de ambas as técnicas (Konigsberg *et al.*, 1978), e cultivadas em meio suplementado com soro (de cavalo e fetal bovino) e extrato embrionário. Além de mitogênico, o extrato embrionário promove melhor adesão celular ao substrato e ainda estimula a fusão de membranas. A adição de cálcio ao meio de cultura eleva a expressão de M-caderinas, proporcionando uma maior taxa de fusão celular e formação de miofibras. Já baixas concentrações de cálcio induzem a inibição da fusão celular, levando ao enriquecimento de mioblastos na cultura (Shainberg *et al.*, 1969).

A proliferação e a diferenciação celular são eventos independentes, pois o sinal que induz a proliferação geralmente inibe a diferenciação. Em contraste com células quiescentes, os miofibras (células multinucleadas) não podem voltar a entrar na fase S do ciclo celular sob condições fisiológicas e, portanto, parecem manter-se permanentemente em G1 (Swierzy e Lüder, 2015). A proliferação dos mioblastos ocorre de 24-36 h após o plaqueamento e ao final deste período inicia-se a diferenciação dos miócitos, células mononucleadas competentes para a fusão. A fusão dos miócitos é dependente da constituição do meio e da densidade celular

(Blondel *et al.*, 1970; Inestrosa *et al.*, 1971; Linkhart *et al.*, 1981; Guimarães *et al.*, 2008; Fatica *et al.*, 2013).

Uma alternativa ao uso de cultura primária de CME é a linhagem celular imortal de músculo esquelético C2C12. Os mioblastos desta linhagem tiveram sua origem a partir de explantes de células satélites do músculo da coxa de camundongos fêmeas normais da cepa C3H, com dois meses de idade, após 70 h da realização de uma lesão por esmagamento. Estas células se diferenciam em miócitos, levando à formação de miotubos e miofibras, sob condições adequadas, tais como a substituição de 20% de soro de fetal bovino por 10% de soro de cavalo (Yaffe e Saxel, 1977).

Nosso grupo foi o pioneiro no emprego de CME como modelo de estudo do ciclo lítico e da cistogênese de *T. gondii*. Esse modelo celular se justifica pelo conhecimento de que o tecido muscular esquelético e o tecido cerebral são sítios de eleição para o encistamento do parasito e persistência da infecção crônica no hospedeiro. Além disso, uma das principais vias de transmissão do parasito, ocorre através do consumo de carne crua ou malpassada (Andrade *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2008, 2009; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a, b; Gomes *et al.*, 2011, 2014; de Oliveira, 2014).

1.3.2. Célula epitelial renal Vero

A linhagem celular epitelial renal Vero foi originalmente isolada da região distal do córtex renal de macaco verde africano adulto normal do tipo *Cercopithecus aethiops* (Yasumura e Kawakita, 1963). As células Vero são linhagens celulares contínuas de mamíferos mais comumente utilizadas em pesquisas (Ammerman *et al.*, 2008), sendo inclusive empregada na manutenção de algumas cepas de *T. gondii in vitro* (Saadatnia *et al.*, 2010; Sivrikaya e Bağrıaçık, 2011; da Costa-Silva *et al.*, 2012).

O emprego de linhagem celular epitelial renal de gato (CRFK) foi introduzido pelo nosso grupo para o estudo da sua interação com bradizoítos de *T. gondii*. Essas células têm demonstrado alta capacidade de formação de cistos *in vitro* de forma espontânea, sem a necessidade de fator indutor da cistogênese (de Muno *et al.*, 2014).

A utilização da célula Vero no contexto dessa dissertação visa identificar o potencial desta célula epitelial renal em formar cistos teciduais espontaneamente, que possam servir de fonte de produção em larga escala de cistos e atender aos 3Rs da sustentabilidade (“reduction” = redução, “refinement” = refinamento, “replacement” = substituição), diminuindo o número de animais experimentais para obtenção de parasitos.

1.4. Aspectos gerais do citoesqueleto das células hospedeiras

A organização interna das células eucarióticas é baseada na estrutura tridimensional dos elementos que compõem o citoesqueleto. Esta estrutura complexa participa de importantes funções celulares que se caracterizam pelas mudanças dinâmicas que ocorrem durante as atividades fisiológicas e estruturais das células. De uma forma geral, o citoesqueleto é construído a partir de três grupos principais de proteínas formadoras de filamento: os microfilamentos, os microtúbulos e os filamentos intermediários.

1.4.1. O citoesqueleto da CME

A característica mais marcante do citoesqueleto da CME é a presença do sarcômero, a unidade de contração muscular. Além dos principais componentes do citoesqueleto, este tipo celular apresenta proteínas acessórias que também podem formar filamentos, como é o caso da miosina.

A actina, altamente conservada em células eucarióticas, é a proteína mais abundante do citoesqueleto juntamente com a miosina. Esta proteína, intensivamente estudada em mamíferos, pode ser encontrada em subunidades globulares (actina G) quando associada a ATP ou formando filamentos (F-actina) quando associada ao ADP. Em condições adequadas, a polimerização da actina é dependente do tempo e da concentração dos monômeros. O “turnover” das moléculas de actina nas miofibras é mais lento do que em outras estruturas celulares, possivelmente devido ao grande número de proteínas associadas à actina

presentes na CME (Costa, 2014; Alves-Costa *et al.*, 2015). No tecido muscular, os microfilamentos de actina são formados por polímeros de α -actina que possuem 6 isoformas diferentes. Estes filamentos emergem dos discos Z e se estendem até o centro do sarcômero. Atuam no processo de contração muscular em associação com outras proteínas (miosina II, tropomiosina e proteínas do complexo troponina), gerando força contrátil em associação com os discos Z dos sarcômeros (Figura 1.4). O comprimento dos microfilamentos de actina é regulado por proteínas que se ligam nas suas extremidades (Capz e tropomodulina) e pela nebulina (Clark *et al.*, 2002; Costa, 2014).

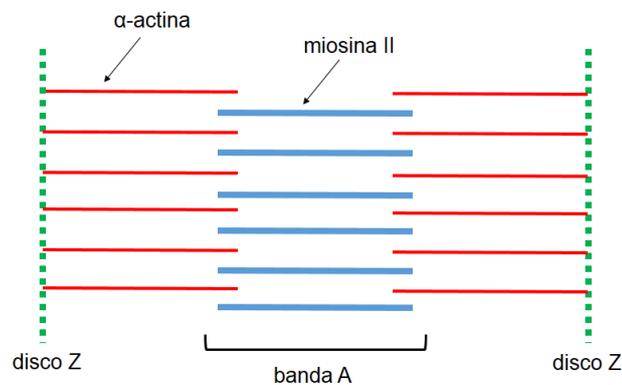


Figura 1.4: Esquema simplificado de um sarcômero. Nesta unidade de contração muscular as faixas mais externas são denominadas de disco Z (verde) de onde emergem os microfilamentos de actina (vermelho). A faixa central é denominada banda A e é composta principalmente pelos filamentos grossos de miosina II (azul)

Os microtúbulos, por sua vez, são formados por polímeros compostos por heterodímeros de subunidades de α e β -tubulina que se organizam em protofilamentos. Eles são estruturas dinâmicas submetidas à contínua montagem/desmontagem e estão envolvidos na motilidade celular, transporte intracelular, na divisão e na determinação da morfologia celular (Azakir *et al.*, 2010). A polimerização da tubulina ocorre a partir do centrossomo (Kapitein *et al.*, 2011) e a dinâmica funcional dos microtúbulos é regulada por uma variedade de proteínas correlacionadas, denominadas proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (Lüders e Stearns, 2007). A MAP-4 é específica de músculo, assim como a proteína MURF-3 (“muscle ring finger protein”), que se co-localiza com microtúbulos nos discos Z dos sarcômeros, sendo fundamentais para formação de miotubos e, possivelmente, atuam na estabilização dos protofilamentos (Gregorio *et al.*, 2005).

Em CME maduras, os microtúbulos são estruturas longitudinais que correm paralelamente ao sarcolema (Azakir *et al.*, 2010).

Os filamentos intermediários e suas proteínas associadas representam um fator chave para a manutenção da integridade estrutural da CME e para a geração da força e estabilidade mecânicas no músculo esquelético. Os filamentos intermediários deste tipo celular são compostos predominantemente pela desmina, uma proteína formadora de homopolímeros. No músculo esquelético maduro, a desmina forma um arcabouço tridimensional que envolve cada disco Z, e se estende do disco Z das miofibrilas superficiais aos costâmeros e ao sarcolema (Hijikata *et al.*, 2003). Os filamentos de desmina também conectam o aparato de contração muscular a várias organelas e compartimentos membranosos, incluindo o núcleo e a mitocôndria (Hnia *et al.*, 2011), os lisossomos (Capetanaki *et al.*, 2007) e potencialmente ao retículo sarcoplasmático (Amoasii *et al.*, 2013). As conexões às muitas organelas são realizadas principalmente por meio do contato da desmina com isoformas de plectina (Figura 1.5) (Castañón *et al.*, 2013). Essas interações controlam a dinâmica mitocondrial e o posicionamento nuclear (Winter e Wiche, 2013). A desmina, apesar de ser uma das primeiras proteínas músculo-específica a ser sintetizada, sendo detectada em somitos e mioblastos, é a última na formação das miofibras, conferindo o padrão estriado característico da fibra muscular (Costa, 2014).

As proteínas acessórias do citoesqueleto de CME alvos deste trabalho foram a plectina e a miosina. A plectina é a proteína responsável pela ligação e ancoragem da rede de filamentos intermediários às organelas e complexos juncionais. É expressa como múltiplas isoformas que apresentam distribuição celular diferencial e possuem papel essencial na formação da citoarquitetura celular (Castañón *et al.*, 2013). A isoforma P1d é a responsável pelo recrutamento e fixação dos filamentos de desmina ao disco Z. A integridade da fibra muscular é mantida pelo eixo estrutural gerado por P1d e P1f, que interliga os sarcômeros em seus discos Z e os conecta ao sarcolema. Já a localização de P1b nas mitocôndrias permite a ligação direta entre esta organela e a rede de desmina. P1 localiza-se principalmente no sistema de membranas nuclear/retículo sarcoplasmático, formando uma plataforma de recrutamento para os filamentos intermediários (Wiche e Winter, 2011; Winter e Wiche, 2013; Castañón *et al.*, 2013). Assim, nas miofibras, o aparelho contrátil está suspenso em uma rede de filamentos de desmina ligada ao envelope nuclear e ao

retículo sarcoplasmático através de P1, aos costâmeros e discos Z através de P1f e P1d, respectivamente, e na mitocôndria através de P1b (Figura 1.5).

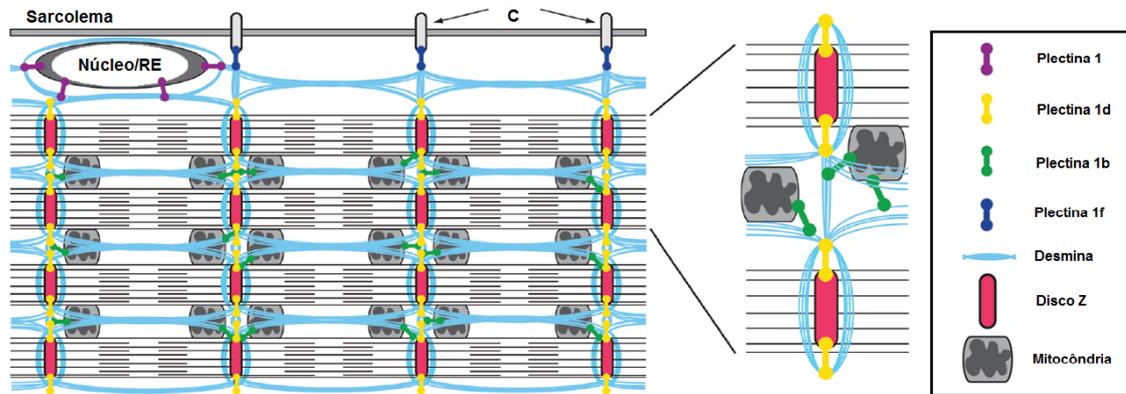


Figura 1.5: Papel da plectina em fibras musculares esqueléticas. Diferentes isoformas de plectina ligam-se aos filamentos de desmina e interliga as miofibras umas com as outras e com o costâmero (C). Neste esquema é demonstrada a localização das quatro isoformas de plectina expressas no músculo. RE, retículo endoplasmático. Adaptado de Wiche e Winter (2011)

A miosina é uma família com 35 diferentes classes de moléculas motoras. Está diretamente envolvida em diferentes processos celulares, tais como o movimento intracelular de organelas, a fagocitose, a motilidade celular, a manutenção da tensão celular e a contração muscular. A classe II é a responsável pela contração muscular em eucariotos superiores (Bloemink *et al.*, 2015). A miosina II é uma proteína muito grande que forma os filamentos espessos do músculo esquelético e está localizada na banda A do sarcômero (Figura 1.4). No músculo, estes filamentos espessos transformam a energia do ATP em trabalho mecânico ao movimentar os microfilamentos de actina em um processo dependente de cálcio. A miosina II possui um domínio motor contendo sítios de ligação para a actina e o ATP, e elementos mecânicos de acoplamento do impulso motor que permitem aos filamentos espessos gerar força mecânica. Esta força é gerada pela “cabeça” da miosina, que ao rodar ciclicamente impulsiona o microfilamento de actina, deformando o sarcômero. O deslocamento linear dos microfilamentos é devido à rotação realizada pela “cabeça” da miosina (Burghardt *et al.*, 2016).

1.4.2. O citoesqueleto da célula epitelial

Os microtúbulos da célula epitelial, assim como na CME, são protofilamentos compostos de heterodímeros dos tipos α e β -tubulina que se associam e formam estruturas ocas. São estruturas altamente dinâmicas e emergem do centrossomo em direção à periferia celular. Dessa forma, os microtúbulos formam o esqueleto básico da célula, sendo responsável principalmente pelos processos de transporte intracelular e mitose. Já os microfilamentos de actina são os responsáveis pela manutenção da forma da célula e proporcionam resistência ao estresse/dano mecânico. Os filamentos de actina também participam da interação entre a célula e o seu meio ambiente (células vizinhas e matriz extracelular) (Pastuszak *et al.*, 2015).

O componente mais diversificado e abundante do citoesqueleto das células epiteliais são os filamentos intermediários de citoqueratina (são mais de 50 isotipos diferentes expressos no epitélio). As citoqueratinas se apresentam em dois tipos (I e II) e formam estruturas filamentosas não uniformemente polarizadas a partir da ligação de duas moléculas, uma de cada tipo (Pastuszak *et al.*, 2015). As redes formadas pelos filamentos têm caráter heterogêneo, sendo compostas por 2 a 10 isotipos diferentes de citoqueratina. Os mecanismos de regulação da sua organização e distribuição permanecem desconhecidos, mas parecem depender do grau de polaridade celular. As citoqueratinas proporcionam rigidez e força ao tecido epitelial ao mesmo tempo em que são dinâmicas e flexíveis. Elas têm sido identificadas com funções regulatórias envolvidas no tráfego de organelas, na motilidade celular, na sinalização da resposta imune e na sobrevivência celular, indicando a plasticidade deste tipo de filamento (Windoffer *et al.*, 2011).

Além disso, os filamentos de citoqueratina estão intimamente relacionados a uma proteína ligante, a plectina. As diferentes isoformas desta proteína são expressas em uma ampla variedade de células e tecidos de mamíferos, incluindo o tecido muscular, como descrito anteriormente, epitelial e nervoso (Winter e Wiche, 2013). Na célula epitelial, a plectina se apresenta como um ligante mecânico entre os filamentos intermediários de citoqueratina e várias estruturas do citoesqueleto (incluindo os microtúbulos, as fibras de estresse e os filamentos periféricos de actina), proteínas encontradas na face interna da membrana plasmática (espectrina e fodrina), complexos transmembrana especializados (pontos de adesão focal, hemidesmossomos e desmossomos) e a lâmina nuclear (Wiche, 1998).

1.5. Aspectos gerais da interação de *T. gondii* e sua célula hospedeira

1.5.1. Mecanismo de invasão da célula hospedeira por *T. gondii*

T. gondii utiliza o deslizamento (“gliding motility”) durante o processo de reconhecimento e adesão à célula hospedeira. Este movimento característico dos membros do filo Apicomplexa é realizado pelo sistema motor actina-miosina do parasito. O reconhecimento, a adesão e a invasão da célula-alvo pelo parasito são mediados por vários tipos de moléculas presentes na superfície da célula hospedeira, tais como, proteínas, carboidratos e lipídeos que interagem com as proteínas secretadas pelos micronemas, rôptrias e grânulos densos (Jones *et al.*, 1972; Alexander *et al.*, 2005; Bradley e Sibley, 2007; Roiko e Carruthers, 2013).

O contato de *T. gondii* com a superfície da célula hospedeira induz o parasito a uma reorientação da posição do seu corpo, de modo que se estabeleça, através da sua extremidade apical, comunicação molecular entre as células. Desse contato inicial se desencadeia uma série de interações moleculares, por meio da extrusão do conóide, com a secreção de proteínas, necessárias para a adesão e invasão, a partir dos micronemas, das rôptrias e dos grânulos densos. O conteúdo dos micronemas é secretado durante o contato inicial com a célula hospedeira, como a proteína MIC2, que se liga especificamente à superfície da célula-alvo. MIC2, juntamente com MIC1, 4, 6 e 8, estão envolvidas com a interação entre o parasito e a célula hospedeira. À medida que *T. gondii* invade a célula, as proteínas dos micronemas são proteoliticamente clivadas da superfície do parasito e em cascata as rôptrias secretam suas proteínas do pescoço (RON). RON2 é inserida na membrana da célula hospedeira a ser invadida, assim como RON4, 5, 8, 9, e 10, formando um complexo na membrana da célula-alvo. Juntas, estas proteínas constituem a junção móvel (JM), um complexo formado na superfície da célula hospedeira que migra ao longo do corpo do parasito enquanto este realiza o processo de invasão ativa (Figura 1.6). Acredita-se que pelo menos um dos componentes do complexo RON2, 4, 5 ou 8 atravesse a membrana da célula-alvo e seja exposto no citoplasma da célula hospedeira. Embora a secreção de ROPs (proteínas localizadas no bulbo das rôptrias) para o interior da célula hospedeira seja sequencial às RONs, as ROPs não são necessárias para a formação da JM. ROP1, ROP2/3/4 e ROP18, além da

proteína dos grânulos densos GRA7, são encontradas no interior das células mesmo antes da entrada efetiva de *T. gondii* (Shen e Sibley, 2012; Walker *et al.*, 2014).

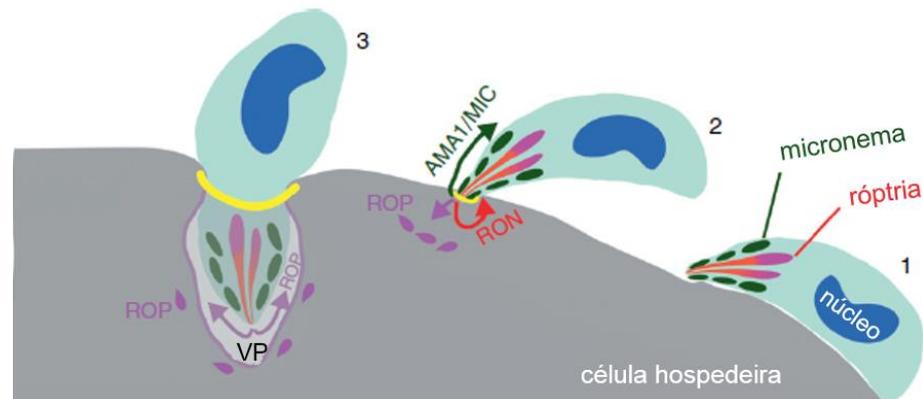


Figura 1.6: A junção móvel é formada durante a invasão da célula hospedeira pelo *T. gondii*. Neste esquema simplificado, (1) *T. gondii* liga-se frouxamente à célula-alvo utilizando uma variedade de adesinas de superfície celular. (2) Em seguida, as moléculas de adesão apicais, como AMA1 e MIC2, são secretadas a partir dos micronemas para a superfície do parasito. A invasão é iniciada pela formação da JM a partir de proteínas secretadas dos micronemas (AMA1) e do pescoço das róptrias (RON). Ao mesmo tempo, o conteúdo das róptrias (ROP) é secretado diretamente no interior da célula hospedeira, onde formam pequenos grupos vesiculares. (3) O parasito se impele através da JM e entra no VP formado pela invaginação da membrana plasmática do hospedeiro. A membrana do VP é extensivamente modificada durante a invasão, a partir da secreção do conteúdo das róptrias e pela exclusão das proteínas da membrana da célula hospedeira. Adaptado de Shen e Sibley (2012)

À medida que o parasito penetra na sua célula hospedeira há o estabelecimento do VP, formado concomitantemente à invasão. Os lipídeos utilizados para a formação do VP são, em sua maioria, derivados da membrana da célula hospedeira e não de organelas intracelulares, como lisossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. *T. gondii* define a composição proteica do VP prevenindo o acúmulo de proteínas transmembranares do hospedeiro, mas não de proteínas ancoradas por GPI. Este mecanismo de exclusão de proteínas da membrana do VP (MVP) parece ser aquele pelo qual o parasito escapa do sistema endolisossomal do hospedeiro (Blader e Saeiji, 2009).

1.5.2. Ciclo lítico e egresso da célula hospedeira

O taquizoíta é a forma evolutiva característica da fase aguda da toxoplasmose e responsável pelo ciclo lítico do parasito. No interior do VP estabelece-se um ambiente propício à sobrevivência e multiplicação dos taquizoítos. Este ambiente inclui a formação da rede túbulo-vesicular (RTV), uma intrincada rede de túbulos limitados por unidade de membrana, resultado da secreção dos grânulos densos. As proteínas GRA são secretadas no VP logo após a invasão e constitutivamente durante a replicação intracelular do parasito, sendo incorporadas tanto à MVP (GRA3, 5, 7 e 8) quanto à RTV (GRA2, 4 e 6). A esta rede foi atribuída a função de sustentação dos parasitos durante os ciclos de endodiogenia (Magno *et al.*, 2005; Vommaro *et al.*, 2014).

T. gondii obtém do hospedeiro os nutrientes que é incapaz de sintetizar *de novo*, como glicose, arginina, ferro, triptofano e nucleosídeos de purina. Estas pequenas moléculas difundem passivamente através da MVP e são bombeadas para o interior do parasito através de moléculas transportadoras, em sua grande maioria ainda desconhecidas, presentes na sua membrana. Em contraste com esses pequenos nutrientes, outros são obtidos de maneira ativa através de mecanismos induzidos pelo parasito. O LDL, por exemplo, é redirecionado para o VP pelos microtúbulos e seus transportadores. Eletromicrografias demonstram que microtúbulos da célula hospedeira se projetam para o interior do VP e formam túbulos membranosos alongados contendo LDL. Esses túbulos estão envoltos por um complexo de proteínas derivado do parasito, incluindo GRA7 (Coppens *et al.*, 2006). No entanto, o mecanismo utilizado pelo parasito para internalizar o colesterol ainda é desconhecido.

Além dos microtúbulos (Andrade *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001; Sehgal *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2008) foi demonstrado que os filamentos intermediários da célula hospedeira, também estão organizados ao redor do VP (Halonen e Weidner, 1994). Na CME, durante o ciclo lítico do parasito, foi demonstrado o remodelamento de tubulina, o desarranjo dos filamentos de actina e a reorganização da miosina, acarretando na perda do perfil estriado da miofibra (Andrade *et al.*, 2001; Gomes, 2011).

O recrutamento de organelas da célula hospedeira, tais como a mitocôndria e o retículo endoplasmático, ocorre rapidamente após a invasão do parasito (revisto em

Sinai, 2008). Mais recentemente, Gomes *et al.* (2014) demonstraram a estreita associação de corpúsculos lipídicos com o VP e com o parasito intravacuolar e ainda, que a infecção induziu o aumento da biogênese desses corpúsculos e modulou positivamente a produção de IL-12, IFN- γ e PGE2. A mobilização de mitocôndrias para a MVP tem sido atribuída, apesar de controversa, à família de proteínas ROP2 (Pernas e Boothroyd, 2010), enquanto a associação com retículo ocorre por um mecanismo ainda desconhecido.

Alguns trabalhos, utilizando a forma taquizoíto de uma cepa do tipo I (RH), demonstraram que *T. gondii* é capaz de desregular o ciclo celular do hospedeiro, detendo-o entre as fases G2/M. O efeito desta intervenção foi independente do tipo celular e ocorreu em células em divisão e senescentes (Molestina *et al.*, 2008). A retirada do gene envolvido na regulação do ciclo celular (UHRF1), que leva a célula à G1, resultou na diminuição significativa do crescimento do parasito (Brunet *et al.*, 2008). Estudos prévios, também utilizando taquizoítos de cepas do tipo I, apoiam esta hipótese, demonstrando que esta forma evolutiva infecta preferencialmente células na fase S (Youn *et al.*, 1991; Grimwood *et al.*, 1996).

Após realizar sucessivos ciclos de endodiogenia, o número de parasitos dentro do VP aumenta, e, conseqüentemente, o tamanho deste vacúolo. Considerando-se que mais de um parasito pode infectar a mesma célula, o espaço intracelular diminui a cada ciclo de replicação de *T. gondii*. Contudo, o egresso não resulta do rompimento da célula hiperparasitada. Em um primeiro momento, há fragmentação da RTV. Assim como na invasão, há extrusão do conóide, seguida da secreção de proteínas dos micronemas semelhantes às porinas, que se inserem na MVP, permeabilizando e fragilizando esta membrana. Assim, a saída dos parasitos do VP é facilitada. No citoplasma, os parasitos deslocam-se randomicamente e eventualmente encontram a membrana da célula hospedeira, também permeabilizada pela ação das porinas. Ao atingir o meio extracelular os taquizoítos estão aptos a invadir novas células (Caldas *et al.*, 2010; Blackman e Carruthers, 2013).

1.5.3. Diferenciação taquizoíta-bradizoíta e formação de cistos teciduais

Durante a fase aguda da infecção, o estágio taquizoíta de *T. gondii* é capaz de invadir, replicar rapidamente no interior da célula hospedeira e evadir, disseminando os parasitos por todo o corpo do hospedeiro. Uma forte resposta imune adaptativa do hospedeiro é capaz de controlar a infecção aguda, porém resulta no estabelecimento da fase crônica, onde taquizoítos são convertidos em bradizoítos, formando os cistos teciduais, principalmente no cérebro, olho e músculos esquelético e cardíaco. Estes cistos podem persistir por toda a vida do hospedeiro e se este, por algum motivo, tornar-se imunossuprimido, a infecção pode ser reativada: os bradizoítos interconvertem para taquizoítos, que se reproduzem e se disseminam, causando lise tecidual e processos inflamatórios podendo levar à morte. Nos hospedeiros infectados, as condições de estresse e a resposta imune são apontadas como indutores naturais do processo de conversão taquizoíta-bradizoíta (Odell *et al.*, 2015).

A diferenciação do parasito pode ser induzida experimentalmente *in vitro* por uma série de manobras, como o choque térmico, a restrição de nutrientes, o pH alcalino ou ácido e uma ampla variedade de drogas (revisto em Wess e Kim, 2000). Análise do transcriptoma do parasito revelou um grande número de genes regulados durante a diferenciação. Estes estudos sugerem que o processo de diferenciação é altamente regulado e que grupos de genes são ligados e desligados em uma ordem temporal específica (Knoll e Boothroyd, 1998; Cleary *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Radke *et al.*, 2005; Lescault *et al.*, 2010).

No cérebro de animais experimentais, os cistos podem ser detectados dentro de 7-10 dias após a infecção, mas características de diferenciação de bradizoítos podem ser detectados 3 dias após a indução da conversão do parasito *in vitro* (revisto em Weiss e Kim, 2000; Guimarães *et al.*, 2008). Em um estudo utilizando tecnologia de imagem (bioluminescência) foi demonstrado que a conversão para bradizoítos começa rapidamente *in vivo*, cerca de um dia após a infecção (Di Cristina *et al.*, 2008). Os cistos podem variar em tamanho e forma, podendo os mais jovens conter apenas 2 bradizoítos e apresentar 5 µm de diâmetro, enquanto cistos maduros podem ter 70 µm e conter ~ 1000 bradizoítos (Dubey *et al.*, 1998).

Os bradizoítos replicam-se muito lentamente no interior dos cistos teciduais, porém, permanecem viáveis e, por conseguinte, garantem a persistência da

infecção. Os bradizoítos diferem dos taquizoítos em vários aspectos, incluindo: (i) alteração da MVP por adição de quitina, glicoproteínas e possivelmente glicolípideos, de modo a formar uma parede cística (PC); (ii) acúmulo de grânulos de amilopectina, refletindo um substancial armazenamento de glicose e, (iii) reorganização subcelular: localização do núcleo numa região mais posterior do corpo do parasito e redistribuição de organelas secretoras importantes para a invasão da célula hospedeira, estabelecimento, manutenção e modificação do VP (Dzierszinski *et al.*, 2004).

A PC possui menos de 0,5 μm de espessura e é elástica para acomodar a expansão do número de parasitos no interior do cisto. É construída a partir da quitina e de glicoproteínas secretadas pelos parasitos (Boothroyd *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 2001). Os açúcares presentes nesta parede são capazes de realizar ligações com as lectinas Concanavalina A (sementes de *Canavalia ensiformis* [aglutinina de soja], Con A), aglutinina de germe de trigo (WGA), aglutinina de semente de soja (SBA) (Sethi *et al.*, 1977) e aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) (Zhang *et al.*, 2001), comumente utilizadas como ferramenta para a marcação da PC. Apenas um número limitado de proteínas de parede/matriz cística foi caracterizado. CST1 é uma glicoproteína de 116 kDa da PC que é o constituinte principal de ligação com DBA (Zhang *et al.*, 2001). A natureza negativa da superfície da PC é dada principalmente pela presença de fosfolípideos (Guimarães *et al.*, 2007). Já na matriz cística, que preenche o espaço entre os bradizoítos (Ferguson e Hutchison, 1987), há a presença de vesículas e túbulos contendo moléculas negativamente carregadas derivadas da membrana que delimita o cisto (Guimarães *et al.*, 2007). Após a ingestão pelo hospedeiro, a parede cística é degradada pela ação da pepsina ácida, liberando os bradizoítos. No entanto, a resistência do parasito à ação da pepsina ácida não pode ser o único critério empregado na distinção entre bradizoítos e taquizoítos (Dubey, 1998).

1.5.4. CME como sítio de persistência de *T. gondii*

A distribuição dos cistos de *T. gondii* nos tecidos de indivíduos cronicamente infectados é dependente da espécie do hospedeiro. Em pequenos roedores, os cistos são encontrados principalmente no cérebro (Dubey, 1997), enquanto em

suínos, ovinos e caprinos - nos músculos esquelético e cardíaco (Tenter, 2009). A CME, assim como o neurônio, é um tipo celular considerado de eleição para a persistência de *T. gondii* durante a toxoplasmose crônica. Este fato foi reafirmado no estudo recente, realizado em porcos e galinhas experimentalmente infectados por oocistos de uma cepa do tipo II (DX) (Swierzy *et al.*, 2013). A localização de cistos no músculo desempenha um importante papel biológico na transmissão do parasito aos hospedeiros carnívoros e onívoros, incluindo o homem (Schlüter *et al.*, 2014). Em um estudo retrospectivo nos Estados Unidos, onde 131 mães deram à luz a crianças infectadas com *T. gondii*, 50% destas relataram o consumo de carne crua ou malcozida (Boyer *et al.*, 2005), sendo que no mesmo período foi obtido o isolamento de parasitos viáveis em carne de porco disponíveis no varejo (Dubey *et al.*, 2005). Estudos multicêntricos na Europa revelaram que o consumo de carne malcozida ou produtos de charcutaria é um importante fator de risco de desenvolvimento de toxoplasmose aguda em mulheres grávidas (Cook *et al.*, 2000).

Em comparação com mioblastos e fibroblastos, os miotubos maduros aumentam consideravelmente a biossíntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias após a infecção com *T. gondii*. Além disso, após o tratamento com IFN- γ , a mais importante citocina na resposta anti-*T. gondii*, os miotubos exibiram uma potente atividade anti-toxoplasma e não desencadearam a conversão de taquizoíto para bradizoíto. Estes resultados demonstram que miotubos maduros são participantes ativos da resposta imune local contra *T. gondii*, que também podem regular a interação entre a CME e o parasito (Takács *et al.*, 2012; Swierzy *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2014).

CME diferenciadas (miotubos/miofibras), semelhante aos neurônios, estão permanentemente na fase G1 pela ação dos inibidores do ciclo celular p21^{Waf1/Cip1} e Rb (“retinoblastoma susceptibility protein”) (Zhang *et al.*, 2013). Miotubos maduros, em contraste com os mioblastos que possuem capacidade proliferativa, criam melhores condições moleculares e celulares para a persistência de *T. gondii* por longos períodos. Eles restringem a replicação do parasito disparando a conversão de taquizoítos em bradizoítos, iniciando a formação de cistos teciduais e estabelecendo a infecção crônica (Guimarães *et al.*, 2008; 2009; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008; 2009a, b; Swierzy e Lüder, 2015).

A associação entre o ciclo celular da célula hospedeira e o processo de conversão do parasito foi demonstrada em diversos trabalhos a partir do emprego de

diferentes tipos celulares. A expressão de CDA-1 (“human cell division autoantigen-1”; inibidor do ciclo celular) em HFF e células HeLa levou tanto à inibição da replicação de *T. gondii* quanto à expressão de marcadores específicos para bradizoítos (Radke *et al.*, 2006). O aumento da expressão de *Tsply2* e *p21^{Waf1/Cip1}* (inibidores do ciclo celular) associado à diminuição da expressão de ciclina B1 (regulador da progressão do ciclo celular para a fase M) acarretou maiores taxas de conversão do parasito e formação de cistos em miotubos maduros de C2C12 quando comparados aos mioblastos (Swierzy e Lüder, 2015).

Ferreira *et al.* (2009a, b) sugeriram que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes para a conversão do parasito. CME de cultura primária infectadas com taquizoítos de uma cepa do tipo I foram capazes de converter *T. gondii* espontaneamente (Ferreira *et al.*, 2009b). Além disso, linhagens musculares demonstraram serem mais eficientes no processo de diferenciação quando comparadas a outros tipos celulares (Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a). No entanto, alguns autores sugerem que não é o tipo celular propriamente dito que determina quando *T. gondii* irá se diferenciar em bradizoítos, mas preferencialmente o estado terminal de diferenciação celular (Swierzy e Lüder, 2015). Até o presente momento, a conversão de *T. gondii* parece ser um processo multifatorial, e tanto o nicho celular quanto o estágio do ciclo celular do hospedeiro parecem influenciar na diferenciação de taquizoíto a bradizoíto e na subsequente formação dos cistos teciduais.

Assim, em função da importância da toxoplasmose crônica na CME, com alto impacto na transmissão do parasito entre hospedeiros intermediários e definitivos e os hospedeiros intermediários entre si, a eleição desse modelo celular se justifica plenamente. Então, o principal foco desta dissertação é contribuir para o melhor entendimento do estabelecimento e manutenção do parasito durante a cistogênese, frente à citoarquitetura das células muscular e epitelial.

II. JUSTIFICATIVA

O citoesqueleto das células hospedeiras que albergam o *Toxoplasma gondii* pode atuar como agente dificultador ou facilitador para o desenvolvimento do parasito, dada sua natureza obrigatoriamente intracelular. O papel dificultador do citoesqueleto seria observado durante o ciclo lítico de *T. gondii*, tendo em vista a trama de estruturas/arca-bouço que o parasito precisa vencer durante o seu egresso, visando a invasão de novas células para expansão da infecção. Por outro lado, pode se constituir como um agente facilitador, atuando como envoltório de proteção e garantia da estadia do parasito na célula hospedeira por longos períodos, com destaque para a fase crônica da doença, que se caracteriza pela permanência do parasito intracelular por meio da formação de cistos teciduais. Conhecer o comportamento do citoesqueleto da célula que alberga o parasito durante essas etapas do ciclo celular de *T. gondii* é nosso desafio. Os poucos estudos nesta área têm concentrado a atenção nos microtúbulos (Andrade *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001; Sehgal *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2008) e filamentos intermediários (Halonen e Weidner, 1994), demonstrando que esses circundam o vacúolo parasitóforo (VP). Até o presente momento, só existe um único estudo demonstrando que filamentos de vimentina envolvem cistos em astrócitos (Halonen *et al.* 1998). Os cistos têm papel fundamental na persistência da infecção por *T. gondii* no hospedeiro e na consequente patogênese da toxoplasmose. A persistência de cistos nas células musculares esqueléticas (CME) é particularmente importante, considerando-se que uma das principais vias de transmissão do parasito em humanos ocorre através da ingestão de carne crua ou malcozida (revisado em Jones e Dubey, 2012).

A CME é uma das células-alvo da infecção crônica de *T. gondii* *in vivo*. A interação deste parasito e culturas primárias de CME tem sido amplamente explorada pelo nosso grupo. Este modelo de interação reproduz características importantes da infecção *in vivo* e permite a análise do desenvolvimento da cistogênese *in vitro* (Andrade *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2008, 2009; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009 a, b; Gomes, 2011; Gomes *et al.*, 2011, 2014; de Oliveira, 2014). Dados prévios do nosso grupo demonstram que durante o ciclo lítico do parasito em CME o citoesqueleto da célula hospedeira sofre remodelamento de tubulina e miosina II ao redor do VP, desorganização dos

filamentos de actina e redução da expressão dos filamentos de desmina (Andrade *et al.*, 2001; Gomes, 2011).

A linhagem celular epitelial renal Vero tem sido apontada como boa produtora de cistos de *T. gondii* (Soête *et al.*, 1993; Soête e Dubremetz, 1996; Weilhammer *et al.*, 2012), apesar de recentemente ter sido imputado que células diferenciadas seriam o nicho mais adequado para a cistogênese (Swierzy e Lüder, 2015). A utilização da célula Vero pode proporcionar uma melhor compreensão do desenvolvimento intracelular de *T. gondii*, emergindo como um bom modelo celular para estudos comparativos do ciclo lítico e da cistogênese. Além disso, há atualmente a necessidade do estabelecimento de bons modelos celulares que possam fornecer parasitos, especialmente quando se trata de cistos e bradizoítos de *T. gondii*. Para obtenção tanto de cistos quanto de bradizoítos a partir do rompimento da parede cística utiliza-se um grande número de animais experimentais, longos períodos para o estabelecimento da fase crônica da infecção (aproximadamente 45 dias) e um delicado processo de isolamento e purificação dessas formas. O emprego das células Vero como produtoras de formas infectantes de *T. gondii* de cepas avirulentas, como a cepa ME-49, abre excelentes perspectivas no campo do desenvolvimento biotecnológico, atendendo aos princípios dos 3Rs da sustentabilidade.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar a distribuição das proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas em células musculares esqueléticas e epiteliais renais durante a cistogênese de *T. gondii* (cepa ME-49), *in vitro*.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Estabelecer protocolos experimentais de indução da miogênese de CME (linhagem C2C12), *in vitro*;
- 2.2. Avaliar a distribuição estrutural das proteínas do citoesqueleto (F-actina, β -tubulina e desmina) e de algumas proteínas associadas (miosina e plectina) em CME e das proteínas F-actina, β -tubulina e citoqueratina na célula epitelial renal (linhagem Vero) durante a cistogênese de *T. gondii*, *in vitro*;
- 2.3. Avaliar a interação e produção de formas infectantes de *T. gondii* da cepa avirulenta ME-49 em células Vero, *in vitro* (resultados complementares).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos em biotério de experimentação sob temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

Todos os experimentos envolvendo animais foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz) licença LW-50/14, e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos (“Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents/NACLAR”).

4.2. Cultivo e manutenção das células hospedeiras

4.2.1. Linhagem celular muscular esquelética C2C12

A linhagem C2C12 utilizada neste trabalho foi obtida do ATCC® (CRL-1772) e trata-se de um subclone da linhagem celular de mioblastos C2 derivadas de células satélite de músculo esquelético de camundongos da linhagem C3H (Yaffe e Saxel, 1977). A partir do monitoramento do crescimento celular e quando a monocamada atingiu a confluência de 80%, as células foram dissociadas em solução de PBS suplementado com 0,01% de EDTA e 0,25% de tripsina durante 5 min a 37°C. Após dissociação, à suspensão celular foi adicionada meio DMEM/F12 com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina e centrifugada durante 7 min a 174 g à mesma temperatura. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e cultivadas em garrafas de 25 cm² (1 x 10⁶ células por garrafa). A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante azul de tripano em PBS (0,4%) e as

células com viabilidade maior que 95% foram utilizadas nos experimentos. As células foram semeadas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e mantidas a 37°C em estufa úmida com atmosfera de 5% CO₂. As culturas foram mantidas semi-confluentes e um novo meio foi adicionado a cada 2 dias.

4.2.2. Linhagem celular epitelial renal Vero

A linhagem celular Vero, oriunda do epitélio distal normal do córtex renal de macaco verde (ATCC® CCL-81™), foi semeada em garrafas de cultura em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, e mantidas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A cada 2 dias, o meio foi descartado e o mesmo volume de meio fresco foi adicionado até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para o subcultivo celular, as células foram incubadas em solução de dissociação contendo PBS suplementado com 0,01% de EDTA e 0,25% de tripsina durante 5 min a 37°C. Após dissociação, à suspensão celular foi adicionado meio DMEM/F12 com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina e centrifugada durante 7 min a 174 g a mesma temperatura. Após a centrifugação, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e mantidas semi-confluentes em garrafas de 25 cm² (1 x 10⁶ células por garrafa). A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante azul de tripano em PBS (0,4%) e as células com viabilidade maior que 95% foram utilizadas nos experimentos. Um novo meio das culturas foi trocado a cada 2 dias.

4.3. Obtenção dos parasitos

A cepa de *Toxoplasma gondii* do tipo II (ME-49, cistogênica) utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.3.1. Bradizoítos

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 pesando entre 15-18 g foram inoculados por via intraperitoneal com cerca de 30 cistos teciduais provenientes de

camundongos previamente infectados. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e deslocamento cervical após 4-8 semanas de infecção e os cistos teciduais isolados e purificados do cérebro para posterior utilização nos ensaios experimentais e na manutenção da cepa.

Resumidamente, para a obtenção dos cistos purificados, os cérebros foram removidos cirurgicamente, sob condições assépticas, lavados, fragmentados com auxílio de uma tesoura e homogeneizados em PBS a 4°C. Posteriormente, foram submetidos a um gradiente de 25% de dextran, com um cérebro por 2,5 ml de solução final, e submetido a centrifugação a 2.200 g durante 10 min. O sedimento contendo os cistos foi recuperado, novamente suspenso em PBS e centrifugado a 400 g durante 10 min. Um volume de 20 µl da suspensão total foi colocada entre lâmina e lamínula (24 x 32 mm) e o número de cistos determinado por contagem total da lamínula. Para a obtenção dos bradizoítos, os cistos foram incubados por 1-5 min a 37°C em solução de pepsina ácida (0,01% pepsina, 1% NaCl e 0,28% HCl em água destilada) na proporção de 1:5 em PBS objetivando o rompimento da parede cística e liberação dos bradizoítos. Para a neutralização da atividade enzimática foi utilizada a solução de 1% carbonato de sódio. A solução celular obtida foi lavada em meio DMEM/F12 por centrifugação a 250 g durante 10 min e o número de parasitos determinado em câmara de Neubauer (Guimarães *et al.*, 2008).

4.3.2 Taquizoítos

Culturas de células Vero foram inicialmente infectadas com bradizoítos na relação parasito-célula hospedeira de 3:1. Após 120 h de infecção, os taquizoítos foram recolhidos do sobrenadante destas culturas a partir da centrifugação diferencial (180 g por 7 min, seguida 1.500 g por 10 min) e transferidos para uma nova cultura para a manutenção da forma evolutiva ou utilizados nos ensaios experimentais.

4.4. Padronização da miogênese e otimização da produção de miofibras em C2C12

4.4.1. Variação na densidade celular

Culturas de mioblastos com cerca de 80% de confluência foram tratadas com 0,01% de EDTA e 0,25% de tripsina durante 5 min a 37°C. Após a dissociação, a suspensão celular foi homogeneizada em meio de manutenção (DMEM/F12 contendo 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 4°C, centrifugada por 7 min a 174 g e quantificada em câmara de Neubauer. As células foram então semeadas em lamínulas de vidro com 132 mm² de área nas seguintes densidades: 5 x 10⁴; 6,25 x 10⁴; 7,5 x 10⁴ e 1 x 10⁵ células por lamínula. Após 24 h de plaqueamento, o meio foi substituído pelo meio de indução da miogênese contendo 1% de SFB, 7 mM de CaCl₂ e 10% SC. O meio de indução foi trocado a cada 2 dias. Duplicatas de três experimentos independentes das culturas foram fixadas após 24, 72, 120 e 168 h de indução da miogênese.

4.4.2. Variação na concentração de cálcio

A partir dos resultados obtidos no item 4.4.1 cerca de 7,5 x 10⁴ células foram semeadas para cada lamínula e induzidas à diferenciação após 24 h de plaqueamento em meios de cultura DMEM/F12 contendo 1% de SFB, 10% de SC, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina com duas diferentes concentrações de CaCl₂: 7 mM (meio de indução A) e 10 mM (meio de indução B). O meio foi trocado a cada 2 dias. Duplicatas de três experimentos independentes das culturas foram fixadas após 24, 72, 120 e 168 h de indução da miogênese realizada pelo meio.

4.4.3. Adição de insulina

Conhecendo-se a densidade celular e a concentração de CaCl₂ ideais para a otimização da miogênese, foi testada a influência da insulina neste processo. Cerca de 7,5 x 10⁴ células por lamínula foram plaqueadas e induzidas à diferenciação após 24 h com o meio de indução DMEM/F12 contendo 1% de SFB, 10% de SC, 10 mM de CaCl₂, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, com presença e

ausência de 100 UI/ml de insulina humana (Novolin® R). O meio de indução das culturas foi trocado a cada 2 dias. Duplicatas de três experimentos independentes das culturas foram fixadas após 24, 72, 120 e 168 h de indução da miogênese realizada pelo meio.

Nestes ensaios experimentais foram utilizados dois tipos de análises: morfológica e quantitativa. Para a análise morfológica e o monitoramento da miogênese, foi realizada citoquímica para revelação de filamentos de actina. Assim, as culturas foram fixadas com 4% PFA diluído em PBS durante 5 min a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes por 10 min em PBS. Em seguida, incubadas com 0,5% de Triton X-100 (Roche) em PBS contendo 4% de BSA (Sigma-Aldrich) por 15 min. As culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com 4 µg/ml de faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich) em PBS contendo 4% de BSA, lavadas 3 vezes por 10 min em PBS e montadas em lâminas com o “antifade” ProLong® Gold contendo DAPI (Molecular Probes). A análise da miogênese e dos microfilamentos de actina foi realizada com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.A2 da Zeiss utilizando objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmara AxioCam MRc.

Para a análise quantitativa, as culturas foram fixadas por 5 min em solução de Bouin (diluição 1:20 em ácido acético glacial a partir da solução estoque - 75 ml de solução saturada de ácido pícrico, 25 ml de formaldeído P.A. 40%, 5 ml de ácido acético glacial) lavadas 3 vezes em etanol 70%, coradas com Panótico Rápido (Laborclin) e montadas em Permount® (Fischer Scientific). A análise quantitativa foi realizada a partir de três experimentos independentes, em duplicata, sendo quantificadas 300 células por lamínula, para os ensaios de densidade celular e concentração de CaCl₂ e 400 por lamínula nos ensaios de avaliação do efeito da insulina. A contagem considerou células mononucleadas (mioblastos/miócitos), com 2-3 núcleos (miotubos) e com número igual ou superior a 4 núcleos (miofibas). As amostras foram analisadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.A2 da Zeiss utilizando objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmara AxioCam MRc. A partir dos resultados foram calculados a média (M) e o desvio padrão (DP).

4.5. Análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto da CME durante a cistogênese de *T. gondii*

Após estabelecidas as condições que otimizassem a miogênese, culturas diferenciadas foram infectadas ou não (controle não-infectado) com taquizoítos de *T. gondii* na relação parasito-célula hospedeira 3:1 por períodos de 72-216 h. Para a análise dos microfilamentos de actina, as CME não-infectadas e infectadas foram fixadas por 5 min a temperatura ambiente em 4% de PFA diluído em PBS. Após a fixação, as culturas foram lavadas 3 vezes por em PBS e incubadas com 0,5% de Triton X-100 em PBS/BSA 4% por 15 min. Em seguida, as culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com 4 µg/ml de faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich) em PBS/BSA 4%. Para a identificação dos cistos teciduais foi utilizada a lectina *Dolichos biflorus* (DBA) conjugada a fluoresceína (1:100) (Vector), que se liga especificamente a grupamentos de GalNAc presentes na parede cística. Após a incubação por 1 h a 37°C com a lectina, as culturas foram lavadas 3 vezes por 10 min em PBS e montadas com ProLong® Gold contendo DAPI. As culturas foram examinadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.M1 da Zeiss utilizando a função ApoTome, objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmera HRm.

Para a análise das demais proteínas, as culturas foram fixadas em 4% de PFA diluído em PBS, permeabilizadas com uma solução contendo PBS/BSA 4% e 0,25% de Triton X-100 (PBS/BSA 4% - Triton 0,25%) a temperatura ambiente por 30 min, seguida por incubação “overnight” a 4°C em câmara úmida com os seguintes anticorpos primários: anti-desmina (1:100) (Sigma-Aldrich), anti-plectina (1:100) (Santa Cruz), anti-miosina (1:100) (Sigma-Aldrich) e anti-β-tubulina (1:200) (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS/BSA 4%. Após a incubação com o anticorpo primário, as culturas foram lavadas 3 vezes por 10 min em PBS/BSA 4% - Triton X-100 0,25% e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com Alexa 488 (Life Technologies) na diluição 1:1.000 em PBS/BSA 4% por 1 h a 37°C. Para a identificação da parede cística, as culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com a lectina DBA-rodamina (1:100) (Vector). Depois disso, as culturas foram lavadas 3 vezes por 10 min em PBS e montadas com ProLong® Gold contendo DAPI. O controle do anticorpo secundário foi realizado por omissão do anticorpo primário. O controle da ligação específica da lectina foi

realizado num ensaio de competição com a adição de 50 mM de GalNAc. As culturas foram examinadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.M1 da Zeiss utilizando a função ApoTome, objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmera HRm.

4.6. Análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto da célula Vero durante a cistogênese de *T. gondii*

As proteínas-alvo para as análises do citoesqueleto foram os filamentos de actina, β -tubulina e citoqueratina. As culturas não-infectadas e infectadas com bradizoítos e taquizoítos na proporção 3:1, foram fixadas em PFA 4% diluído em PBS após 72, 120 e 168 h de infecção. Para a análise dos microfilamentos de actina, as culturas foram lavadas 3 vezes em PBS e permeabilizadas por 30 min numa solução de 50 mM de NH_4Cl em PBS e por 60 min em PBS/BSA 4% - Triton X-100 0,05%. Em seguida, as culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com 4 $\mu\text{g/ml}$ de faloidina-fluoresceína (Sigma-Aldrich) em PBS/BSA 4%. Para a identificação da parede cística, as culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com a lectina DBA-rodamina (1:100) em PBS/BSA 4%, lavadas 3 vezes por 10 min em PBS e montadas com ProLong[®] Gold contendo DAPI.

Para a análise das demais proteínas, as células foram fixadas em PFA 4% diluído em PBS e após a fixação, permeabilizadas por 30 min numa solução de 50 mM de NH_4Cl em PBS e por 60 min em PBS/BSA 4% - Triton X-100 0,05%. As culturas foram incubadas por 2 h a 37°C com os anticorpos primários anti- β -tubulina (1:100) e anti-citoqueratina (1:200) (Sigma-Aldrich) diluído em PBS/BSA 4%. Em seguida, as células foram lavadas com PBS/BSA 4%-Triton X-100 0,05% e incubadas durante 1 h a 37°C com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com Alexa 488 (1:1.000) em PBS/BSA 4%. Para a identificação da parede cística, as culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com a lectina DBA-rodamina. Após lavagem em PBS, as culturas foram montadas ProLong[®] Gold contendo DAPI. Os controles das reações foram realizados na ausência do anticorpo primário e para a lectina DBA foi realizado um ensaio de competição com a adição de 50 mM de GalNAc. Para a análise dos microfilamentos de actina foi utilizado o microscópio de fluorescência Imager.M1 da Zeiss utilizando

a função ApoTome, objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmera HRm, enquanto a análise da β -tubulina e citoqueratina foram realizadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.A2 da Zeiss utilizando objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmera AxioCam MRc.

V. RESULTADOS

5.1. Aprimoramento da produção de miotubos/miofibras em culturas da linhagem celular C2C12

Com o intuito de obter culturas da linhagem C2C12 ricas em células diferenciadas que pudessem ser utilizadas nos experimentos posteriores de interação parasito-célula hospedeira, foram empregadas três diferentes estratégias experimentais. A primeira delas foi a variação na densidade celular, uma vez que o reconhecimento e os contatos célula-célula são pré-requisitos para o estabelecimento da fusão de membranas, estabelecendo-se assim a miogênese. As quatro diferentes densidades (5×10^4 ; $6,25 \times 10^4$; $7,5 \times 10^4$ e 1×10^5 células) utilizadas nestes ensaios foram calculadas levando-se em consideração o tempo de divisão celular da linhagem C2C12 e a área fornecida para o crescimento das células (132 mm^2). A indução da miogênese nestas culturas foi realizada num período de 24 a 168 h. A análise quantitativa das culturas indicou a densidade celular inicial de $7,5 \times 10^4$ como aquela com maior número de miotubos a partir de 120 h e que ao final de 168 h de indução quase o dobro de miotubos foram observados nestas condições (Figura 5.1). Todas as densidades testadas foram capazes de induzir a diferenciação dos mioblastos em miotubos durante o curso do experimento (Figura 5.2). No entanto, apenas o inóculo de $7,5 \times 10^4$ permitiu a manutenção das culturas por períodos mais longos, característica indispensável para a utilização destas culturas nos ensaios posteriores de infecção, levando-se em conta que o alvo principal desta dissertação é o estudo da cistogênese, que requer períodos longos de interação parasito-célula hospedeira. Sendo assim, esta foi a densidade celular de eleição para os testes posteriores visando a otimização da miogênese.

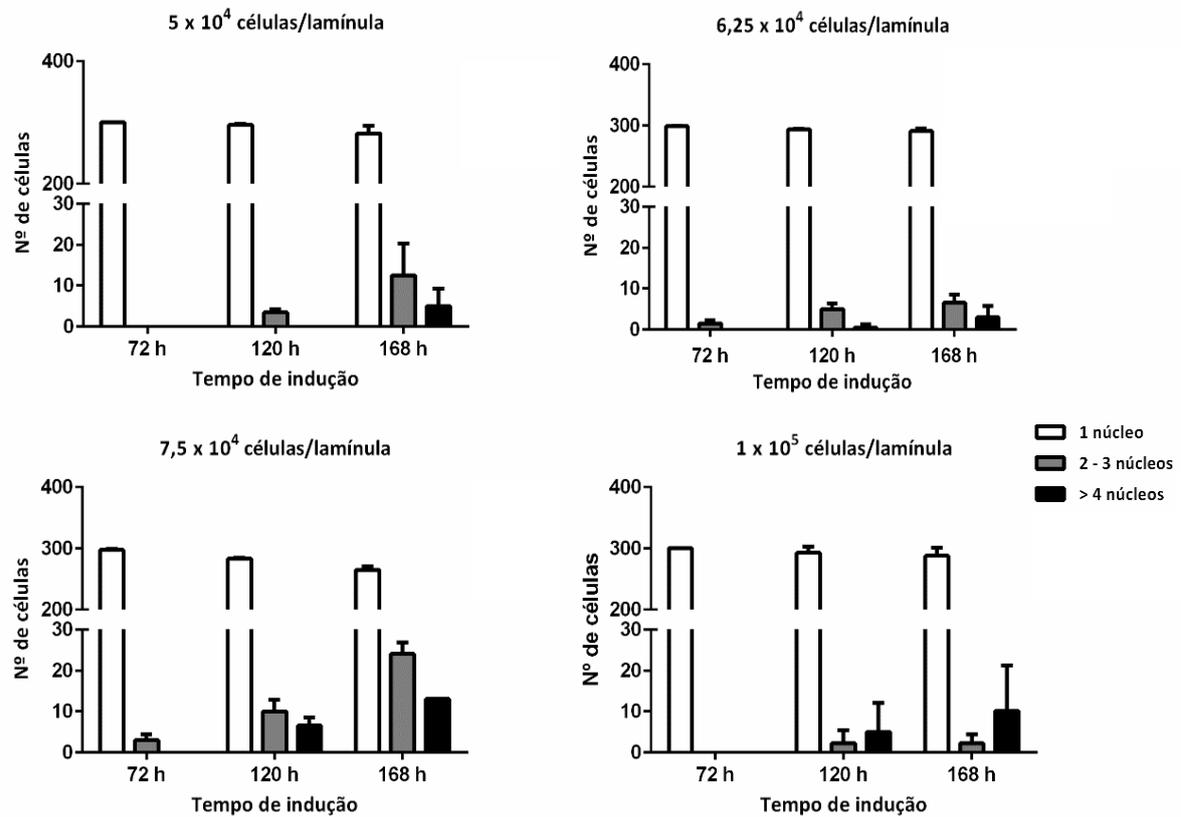


Figura 5.1: Influência da densidade celular na diferenciação de mioblastos da linhagem celular C2C12. Quatro diferentes densidades celulares induzidas à diferenciação em períodos de 24 a 168 h. A análise quantitativa das culturas após 72, 120 e 168 h indicou o inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células como aquele com maior número de células com dois ou mais núcleos ao final do ensaio.

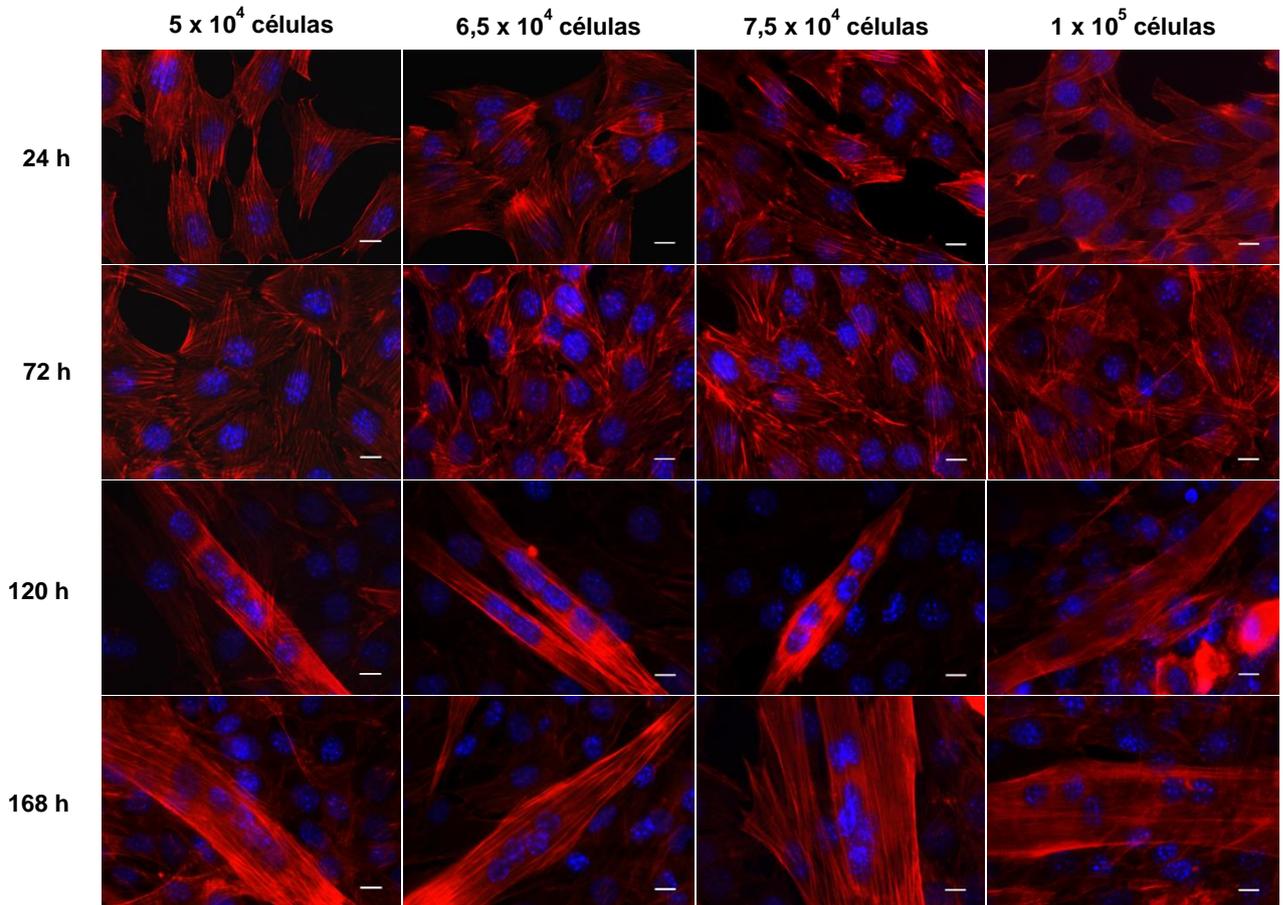


Figura 5.2: Morfologia celular do processo de miogênese em diferentes densidades celulares por microscopia de fluorescência. Marcação dos filamentos de actina (em vermelho) e dos núcleos (em azul) permitindo a evidenciação de células mononucleadas (mioblastos e miócitos) e multinucleadas (miotubos) na linhagem C2C12. Os campos representativos indicam a maior incidência de miotubos a partir de 72 h, corroborando os dados quantitativos. Barra: 10 μ m

Uma vez estabelecida a densidade celular ideal, foi empregada a segunda manobra experimental. Esta consistiu na variação da concentração de cálcio no meio de indução da cultura. A presença de cálcio no meio potencializa a formação de células multinucleadas através da atuação das M-caderinas, proteínas de adesão envolvidas na fusão de membranas, o que justifica a implementação desta estratégia. A influência de duas diferentes concentrações de CaCl_2 , 7 e 10 mM, foi testada sobre inóculo de $7,5 \times 10^4$ células num período de 24 a 168 h. A concentração de 10 mM de CaCl_2 demonstrou melhor desempenho na indução da miogênese através da análise quantitativa destas culturas, com a maior formação de miotubos ao final de 168 h (Figura 5.3). A morfologia destas culturas indicou a presença de células multinucleadas nas duas condições testadas durante o curso do experimento (Figura 5.4).

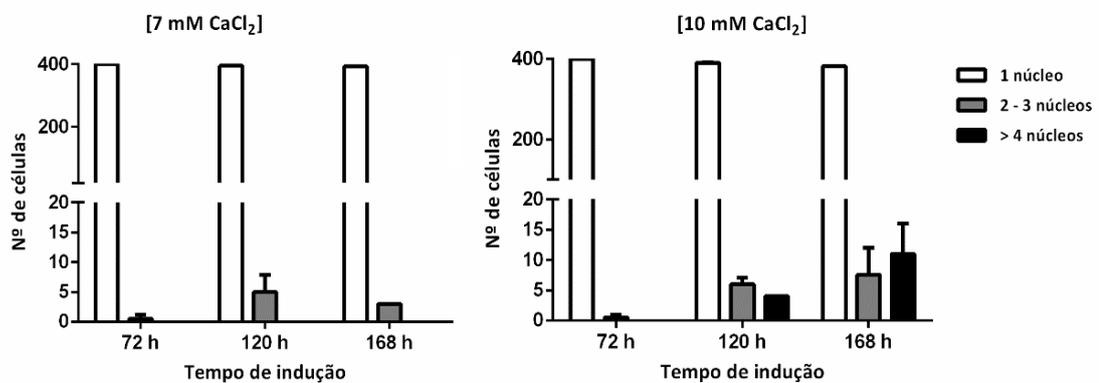


Figura 5.3: A concentração de cálcio no meio de cultura modula positivamente a formação de miotubos em C2C12. Os gráficos mostram o número de miotubos formado nas concentrações de 7 mM e 10 mM de CaCl₂, respectivamente. A quantificação das culturas foi realizada após 72, 120 e 168 h de indução da diferenciação celular. A maior concentração testada (10 mM CaCl₂) foi a mais eficaz na promoção da miogênese.

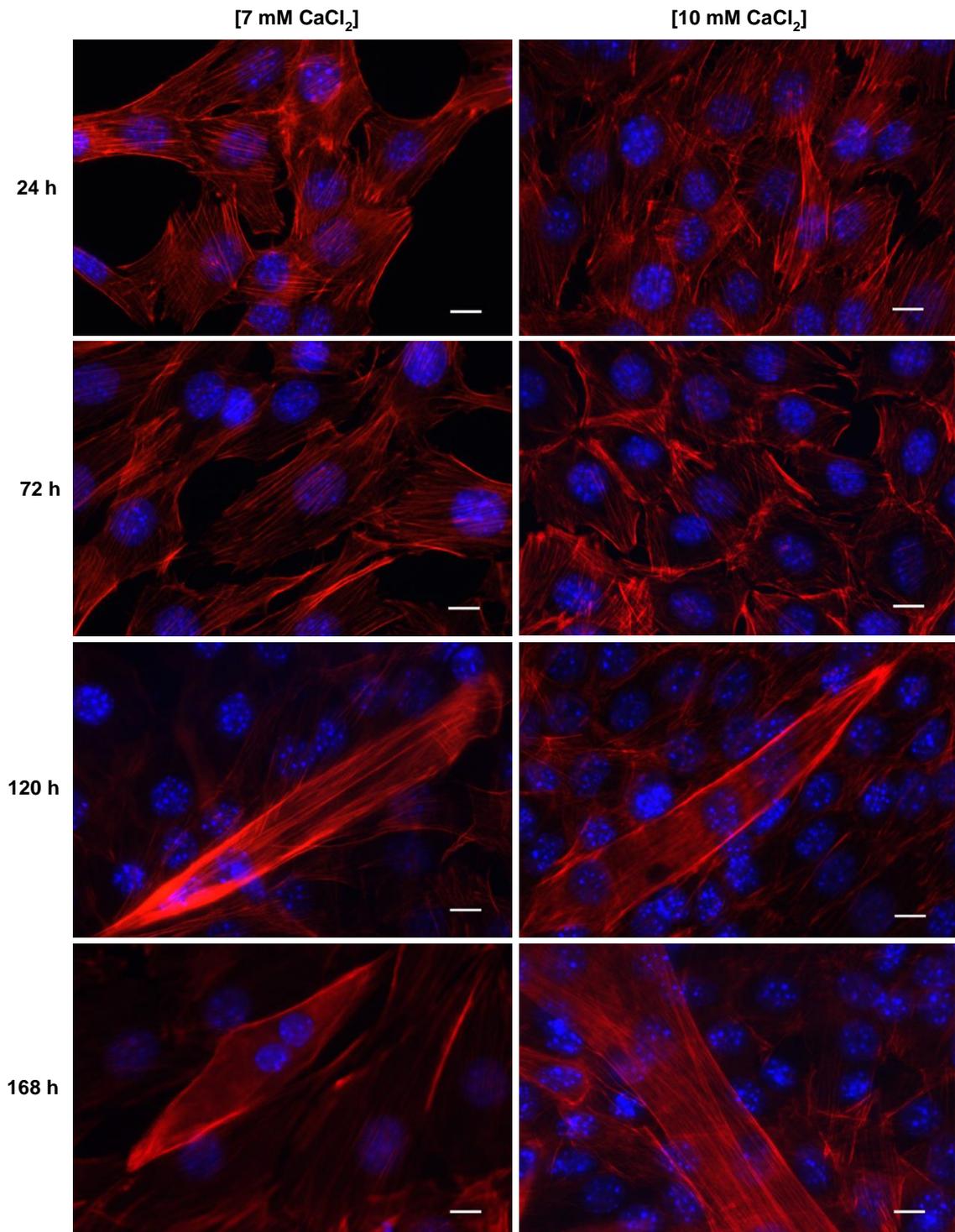


Figura 5.4: Microscopia de fluorescência dos aspectos morfológicos das culturas de C2C12 induzidas à diferenciação a partir de diferentes concentrações de cálcio no meio de cultura. Filamentos de actina (em vermelho) e os núcleos com DAPI (em azul) de células em diferentes estágios de diferenciação. Os campos representativos indicam a maior incidência de células multinucleadas a partir de 120 h de indução nas duas condições testadas, corroborando a análise quantitativa destas culturas. Barra: 10 μ m

Por fim, foi avaliada a capacidade da insulina em promover a diferenciação celular no nosso sistema: $7,5 \times 10^4$ mioblastos com meio de indução contendo 10 mM de CaCl_2 . A insulina é capaz de induzir a miogênese na linhagem celular C2C12 através da atuação sobre diferentes vias metabólicas que retiram o mioblasto, célula com capacidade de replicação, do seu ciclo celular, arrastando-o para G0. Culturas tratadas (+) e não-tratadas (-) com 100 UI/ml de insulina humana foram induzidas à diferenciação de 24 a 168 h. Ambas as culturas foram capazes de formar células diferenciadas a partir de 72 h, mas apenas aquelas tratadas com insulina apresentaram intensa produção de miotubos neste período, chegando a formação de 40% de miofibras, estágio mais avançado da diferenciação da célula muscular *in vitro*, ao final de 168 h (Figuras 5.5 e 5.6). As análises morfológicas destas culturas corroboraram a quantificação das mesmas (Figura 5.7).

Sendo assim, a diferenciação dos mioblastos derivados da linhagem C2C12 empregados nos experimentos seguintes de interação parasito-célula hospedeira foi realizada utilizando-se o inóculo celular inicial de $7,5 \times 10^4$ mioblastos e a indução da diferenciação celular em um meio de cultura contendo 10 mM de CaCl_2 e 100 UI/ml de insulina humana, a partir de 24 h de plaqueamento.

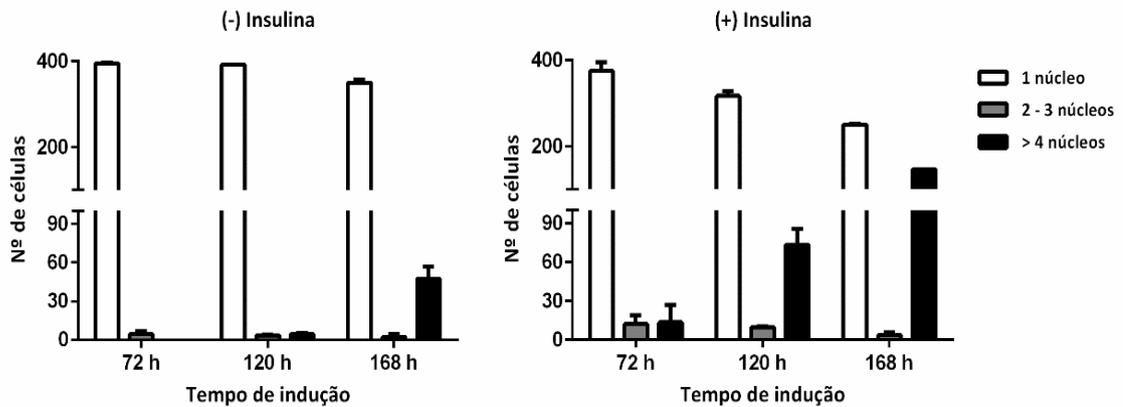


Figura 5.5: Atuação da insulina sobre a miogênese de células da linhagem C2C12. Dados obtidos a partir da análise quantitativa de culturas não-tratadas (-) e tratadas (+) com 100 UI/ml de insulina humana nos tempos de 72, 120 e 168 h de indução de miogênese.

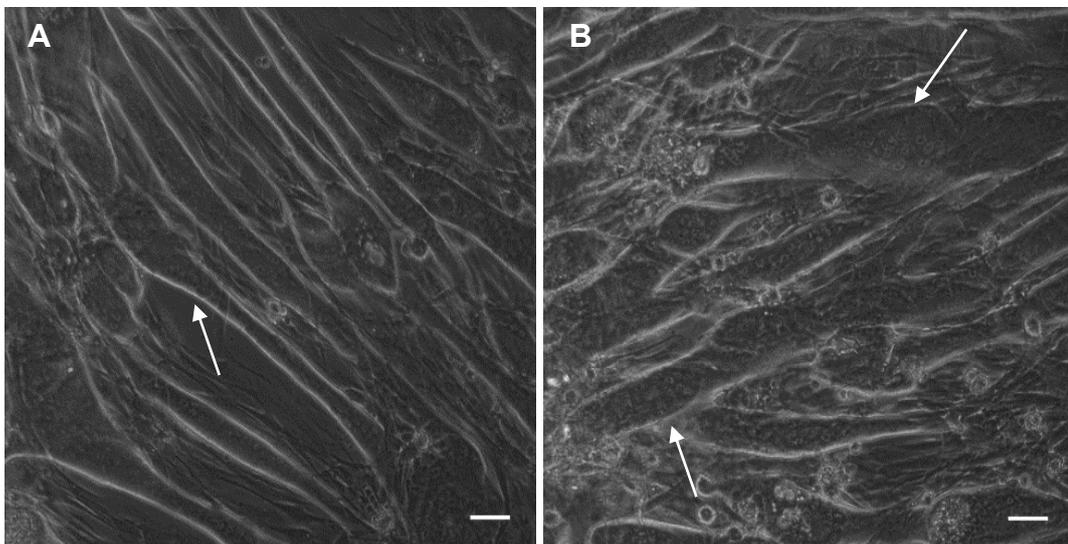


Figura 5.6: Estágio mais avançado de diferenciação celular da linhagem C2C12. Culturas vivas observadas por microscopia de luz de contraste de fase 168 h após a indução da miogênese com adição de 100 UI/ml de insulina humana ao meio (A e B). As setas mostram as miofibras, células caracterizadas pela presença de 4 ou mais núcleos, as quais representam o estágio mais avançado de diferenciação da célula muscular *in vitro*. Barra: 20 μ m

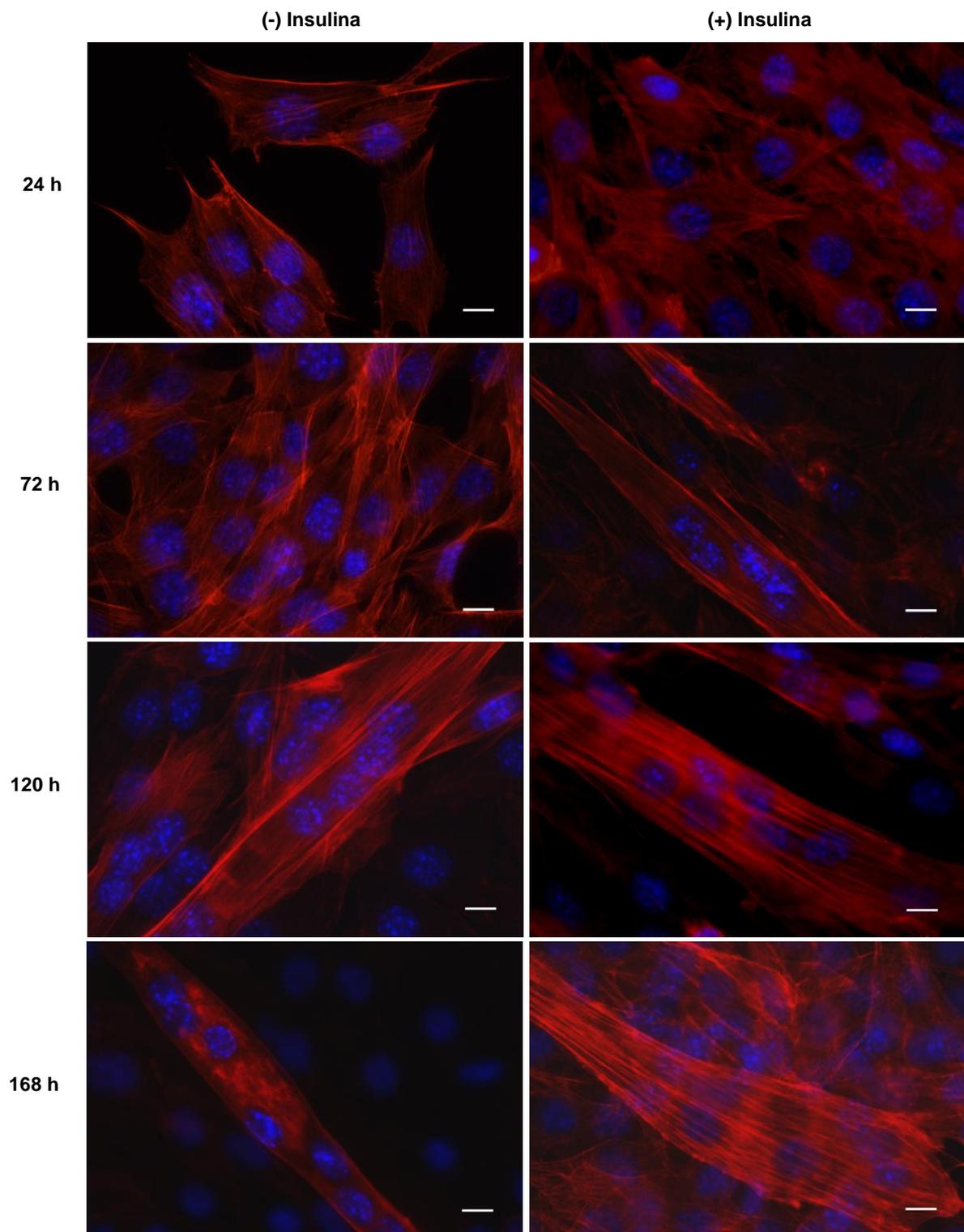


Figura 5.7: Análise estrutural das culturas de C2C12 não-tratadas e tratadas com insulina. Culturas não tratadas com insulina iniciaram a formação de miofibras apenas 120 h após a indução da diferenciação celular. Nas culturas tratadas a evidência de miofibras foi possível a partir de 72 h pós-tratamento. Filamentos de actina com faloidina em vermelho. Núcleos com DAPI em azul. Barra: 10 μm

5.2. Análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas em CME durante a cistogênese de *T. gondii*

Após estabelecer os parâmetros ideais para a otimização da miogênese empregamos o estágio taquizoíta da cepa ME-49 de *T. gondii* para infecção de culturas diferenciadas de CME. As análises estruturais de proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas foram realizadas em culturas infectadas ou não (controle não-infectado) após 72-216 h de infecção por microscopia de fluorescência. Todas as alterações da disposição das proteínas detectadas neste trabalho não foram diretamente dependentes do tempo de infecção, mas da presença do parasito.

A análise dos microfilamentos de actina de culturas de células C2C12 controle (células não-infectadas) demonstrou padrões distintos de distribuição destes filamentos em células mononucleadas e em miotubos/miofibras. Em células mononucleadas (mioblastos/miócitos), os filamentos de actina são distribuídos em feixes por todo o citoplasma e mais concentrados na região imediatamente abaixo do sarcolema e nos pontos de adesão focal ao substrato (Figura 5.8 A e B). Nas células diferenciadas multinucleadas (miotubos e miofibras), este padrão se mostrou alterado: os microfilamentos estavam dispostos paralelos ao sarcolema (Figura 5.9 A e B). Como neste tipo celular os microfilamentos de actina são encontrados no sarcômero, o padrão estriado da miofibra foi evidenciado pela marcação da F-actina (Figura 5.9 A e B). Após inúmeras análises de miotubos/miofibras apresentando cistos de *T. gondii*, não fomos capazes de identificar se houve alguma alteração no perfil de organização dos filamentos de actina nestas CME infectadas, como pode ser observado na figura 5.10.

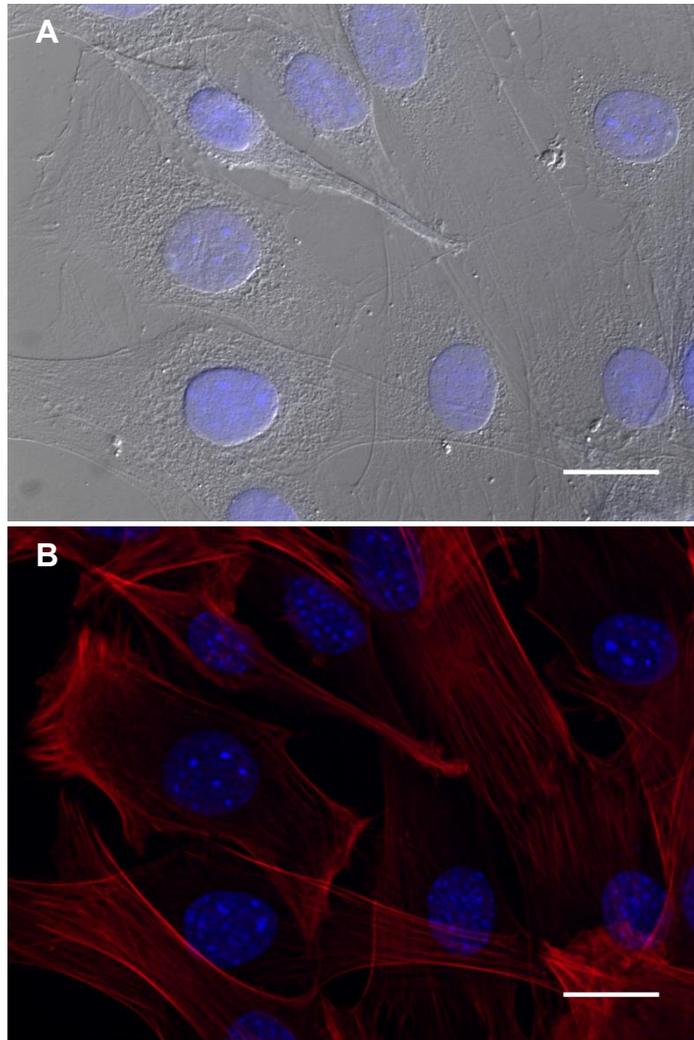


Figura 5.8: Distribuição dos filamentos de actina em células mononucleadas sem infecção da linhagem C2C12. Contraste diferencial interferencial (DIC) evidenciando células mononucleadas (A). Os filamentos de actina (em vermelho) nessas células distribuíram-se por todo o citoplasma e com maior concentração logo abaixo da membrana plasmática, nos pontos de adesão focal ao substrato (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra 20 μm

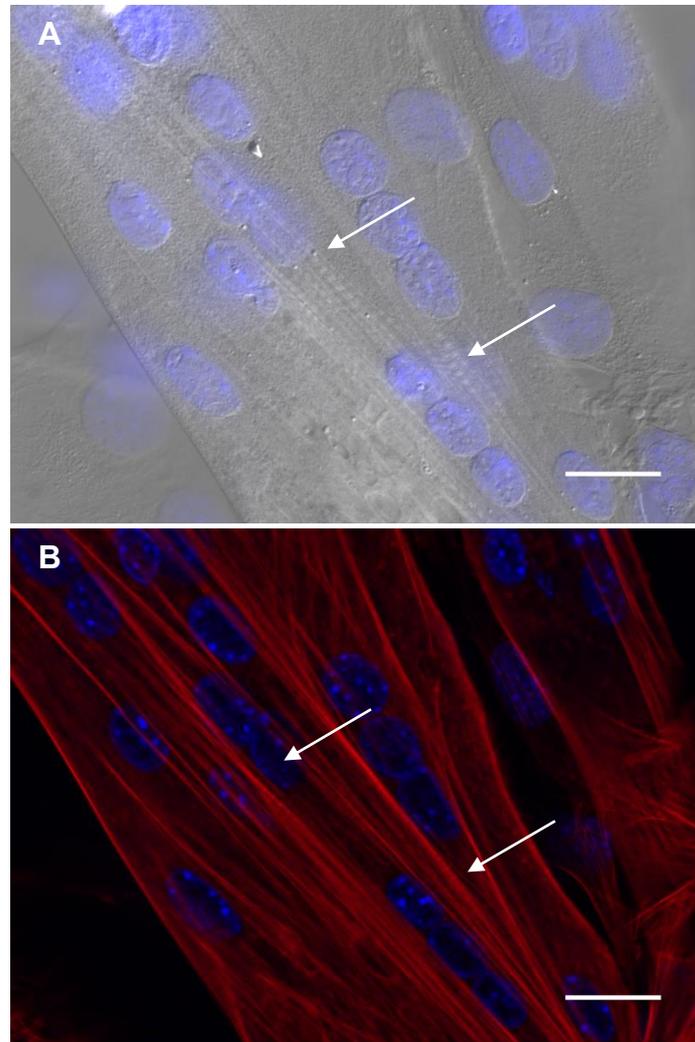


Figura 5.9: Organização estrutural dos microfilamentos de actina em miotubos nas células da linhagem C2C12 sem infecção. Cultura celular diferenciada observada por DIC demonstrando a presença de diversas miofibras e seu padrão estriado (setas), característico do tecido muscular estriado esquelético (A). Disposição dos filamentos de actina (em vermelho) em miotubos apresentando feixes de microfilamentos paralelos ao sarcolema. As estriações (setas) destas células foram evidenciadas pela marcação da F-actina (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

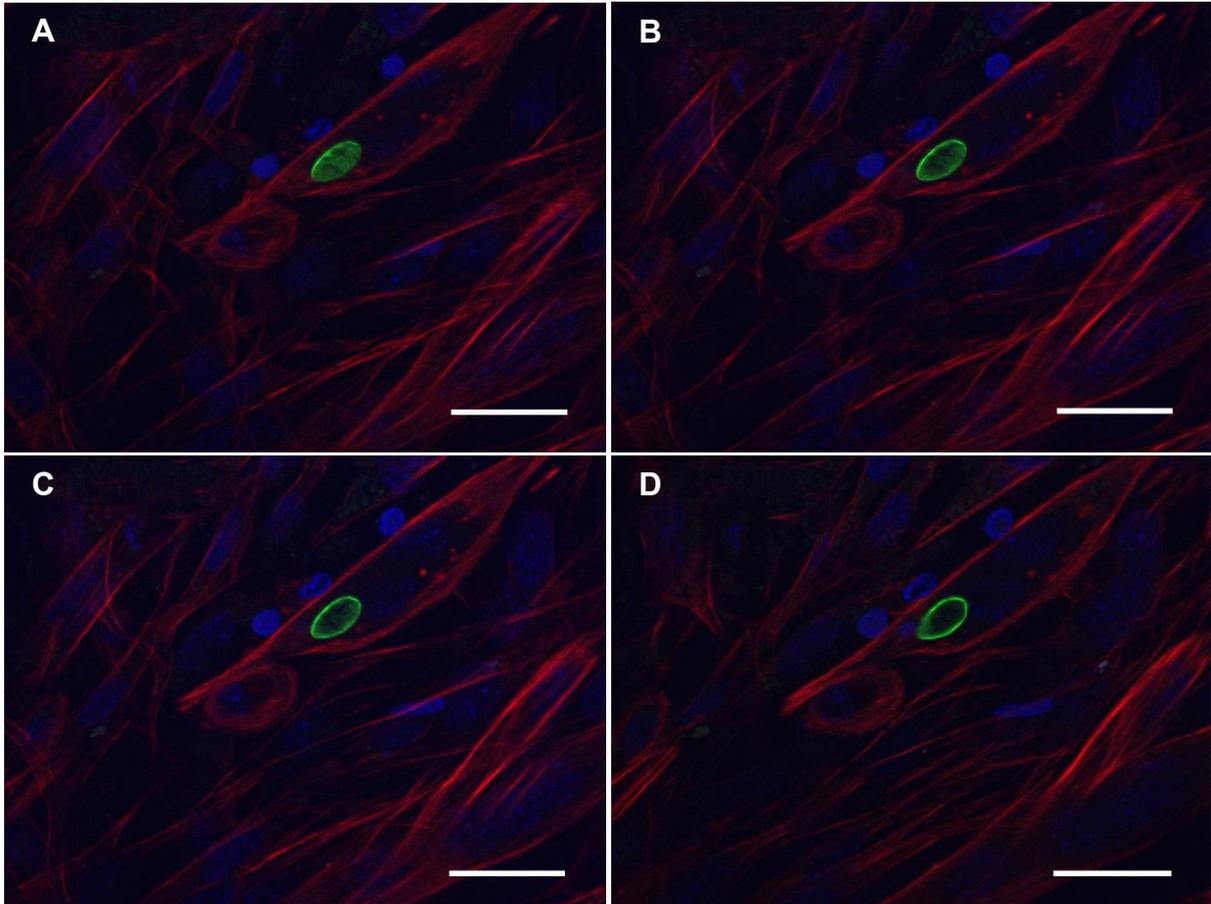


Figura 5.10: Análise do impacto da presença do cisto de *T. gondii* sobre os microfilamentos de actina de um miotubo. As imagens (A-D) correspondem à cortes de 0,25 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ no eixo Z de um campo contendo um miotubo após 168 h de infecção. Organização estrutural dos filamentos de actina (em vermelho) sem qualquer tipo de alteração. Núcleos evidenciados pela marcação com DAPI (em azul) e o cisto pela reação com a lectina DBA (em verde). Barra: 20 μm

Os microtúbulos foram avaliados pela identificação das subunidades de β -tubulina, que, juntamente com as subunidades de α -tubulina, organizam-se em protofilamentos. Nos mioblastos, os microtúbulos estavam presentes por todo o citoplasma celular, sem uma organização específica (Figura 5.11 A e B). Já nos miócitos e miotubos/miofibras, os microtúbulos se mostravam estruturados longitudinalmente com relação ao eixo principal da célula (Figura 5.12 A e B). Em CME apresentando cistos de *T. gondii* foi possível detectar a reorganização da β -tubulina ao redor de cistos presentes no interior de mioblastos (Figuras 5.13 A-C e 5.14 A-C). Estas células apresentaram um pequeno espaço entre a parede dos cistos e o remodelamento da β -tubulina, onde não houve marcação para a lectina DBA ou β -tubulina. A reestruturação dos microtúbulos foi ausente em miotubos/miofibras (Figuras 5.15 A-C e 5.16 A-C), indicando que a alteração da β -tubulina promovida pela presença do cisto de *T. gondii* é dependente do estágio de diferenciação da CME.

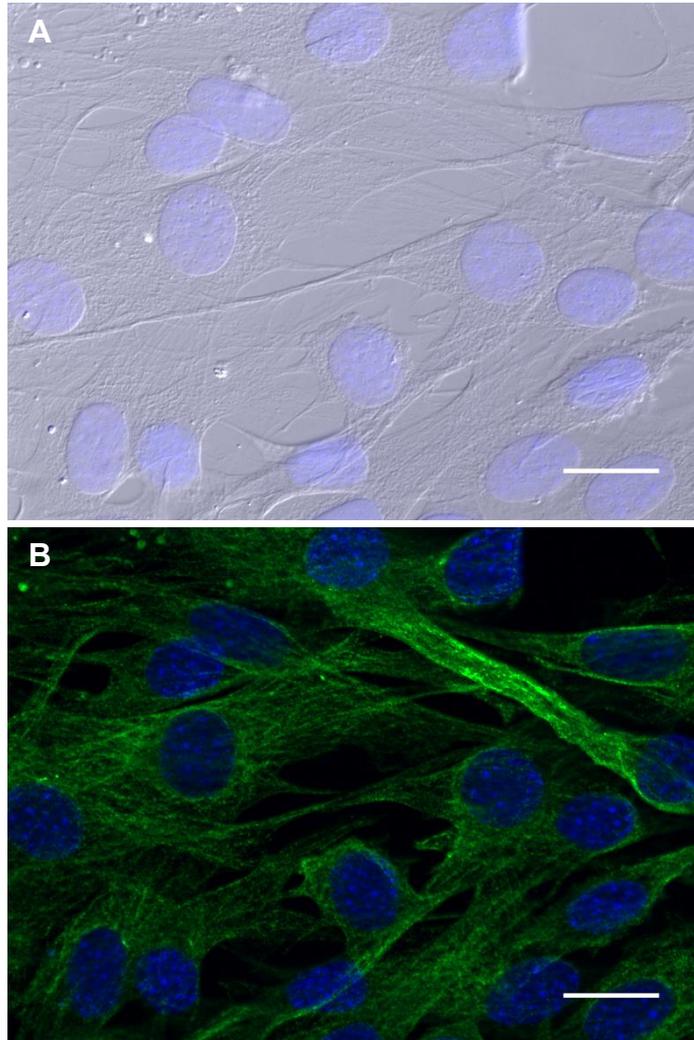


Figura 5.11: Distribuição da β -tubulina em mioblastos sem infecção da linhagem celular C2C12. Mioblastos observados por contraste diferencial interferencial (DIC) (A). Distribuição da β -tubulina (em verde) em rede (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra 20 μ m

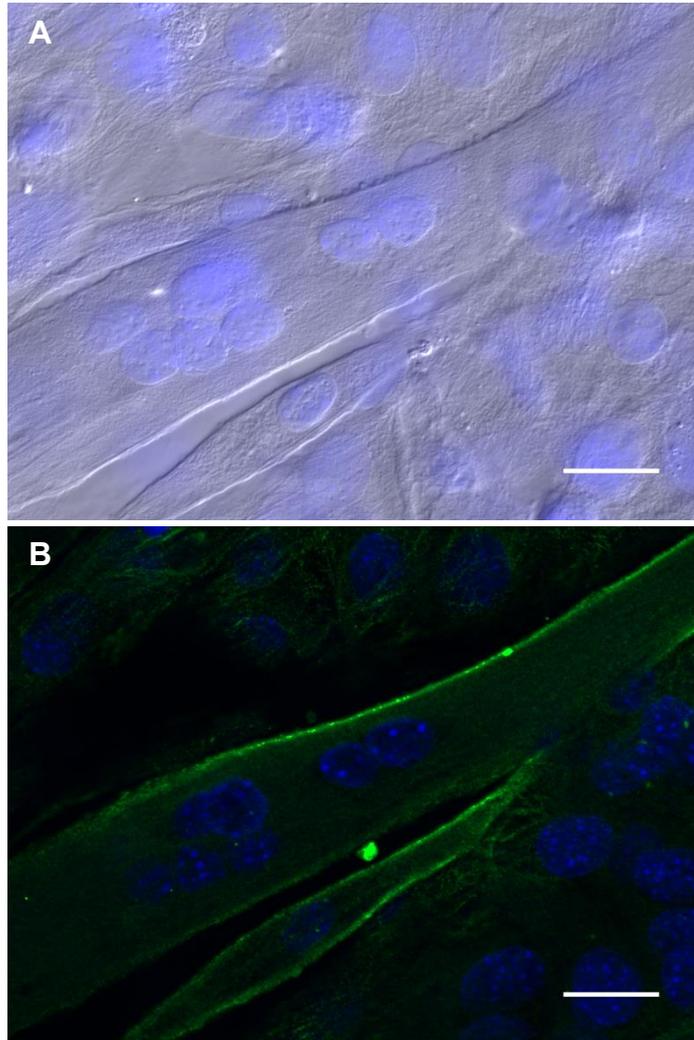


Figura 5.12: Organização dos microtúbulos em miofibra e miócito da linhagem celular C2C12 sem infecção. DIC evidenciando a presença de uma miofibra e um miócito (A). Distribuição dos microtúbulos (em verde) longitudinal e paralela ao sarcolema na miofibra e no miócito (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 µm

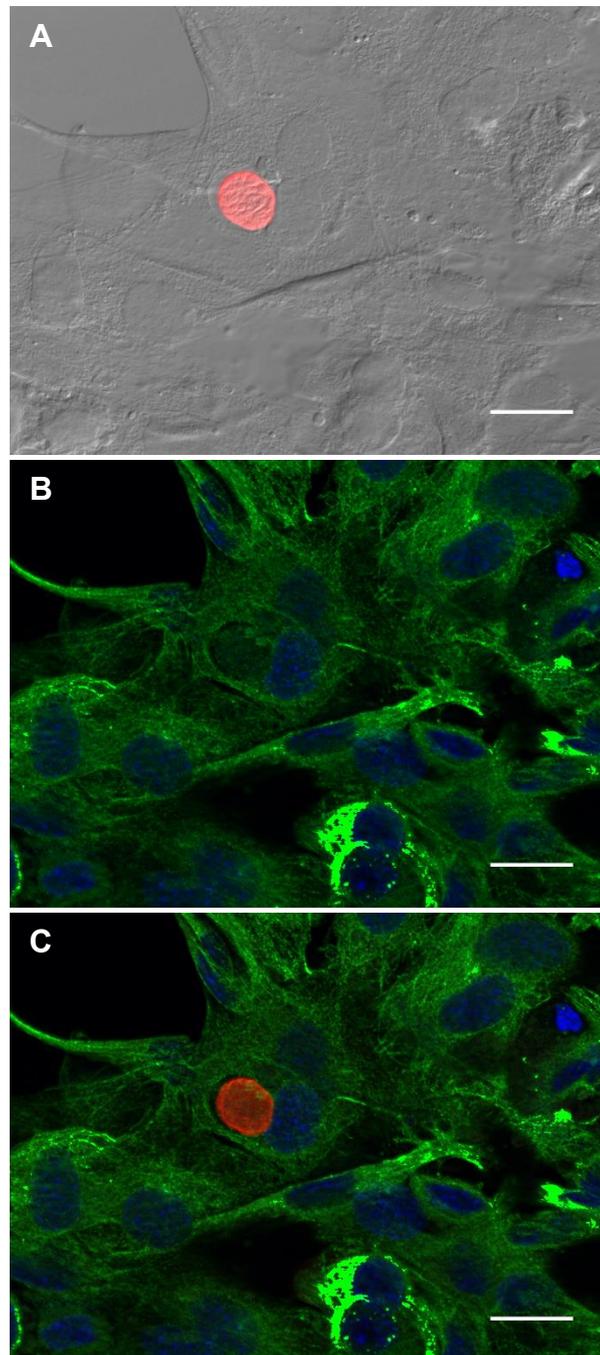


Figura 5.13: Reorganização da β -tubulina ao redor de um cisto de *T. gondii* no interior de um mioblasto (C2C12). Célula mononucleada após 216 h de infecção contendo um cisto (em vermelho) no seu interior vista por DIC (A). Reestruturação da β -tubulina (em verde) no entorno do cisto. Nota-se a presença de um espaço entre a parede cística e o remodelamento da tubulina (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

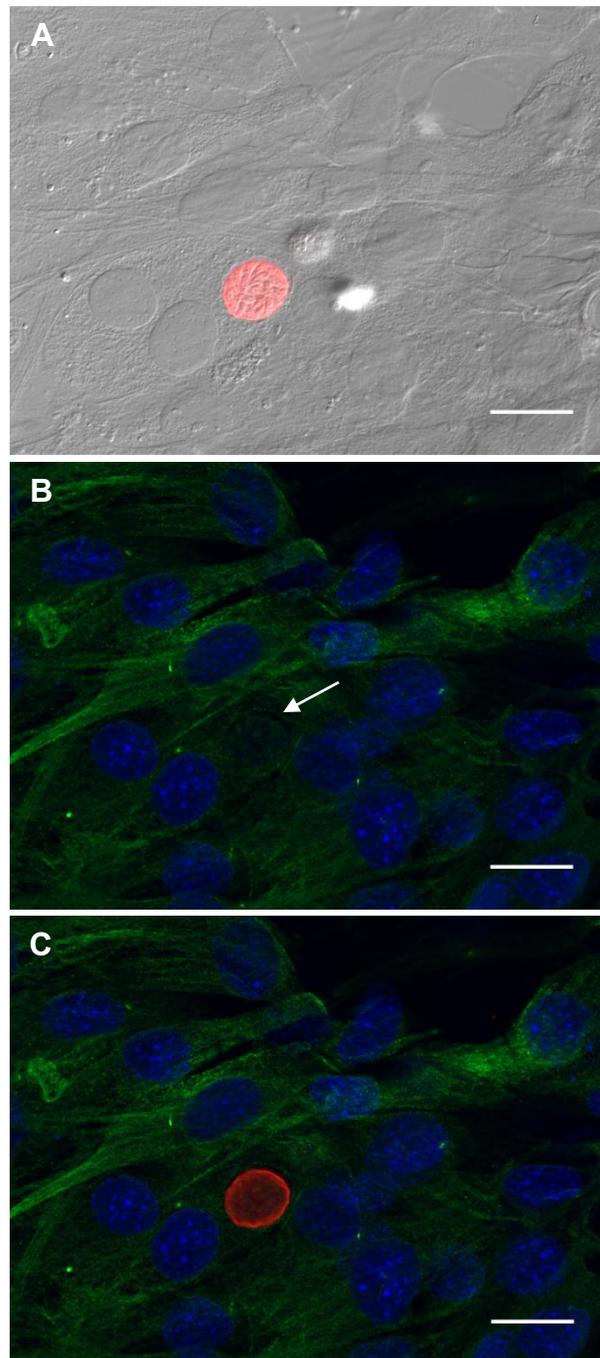


Figura 5.14: Remodelamento da proteína β -tubulina ao redor de um cisto de *T. gondii* no interior de um mioblasto (C2C12). Célula mononucleada evidenciada por DIC contendo um cisto (em vermelho) no seu interior após 216 h de infecção (A). Tubulina (em verde) nas proximidades onde se localiza o cisto, com estruturação modificada circundando a estrutura cística (B). Espaço (seta) entre a parede cística e o local de remodelamento da β -tubulina (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

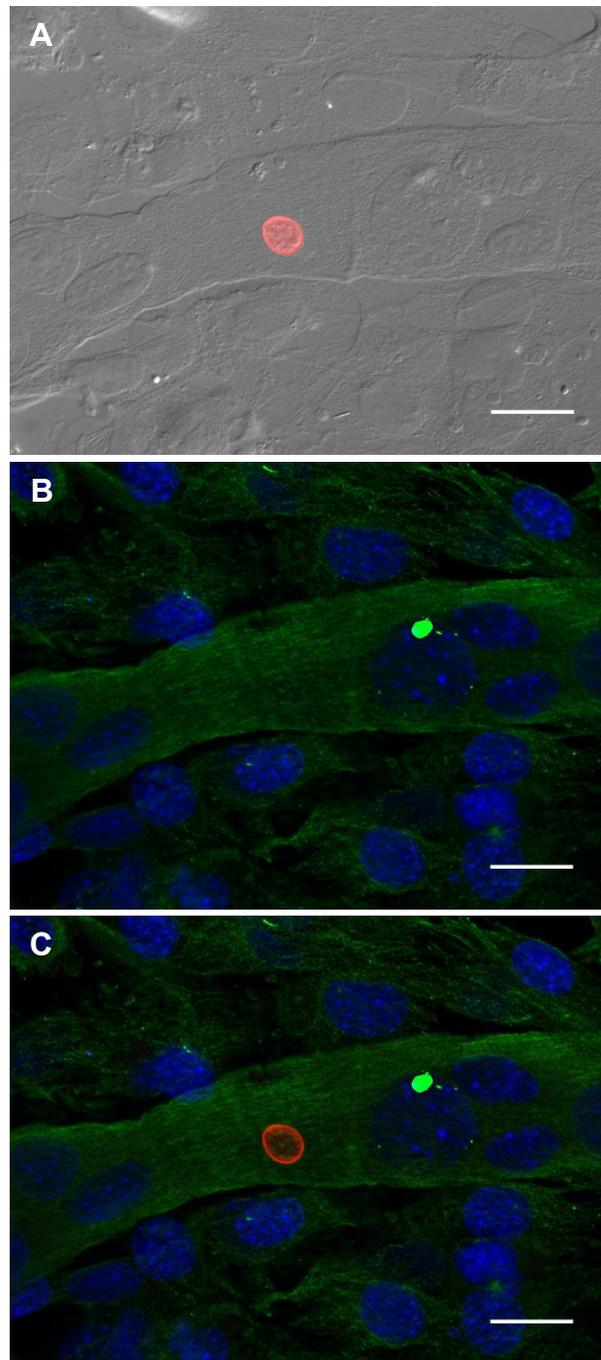


Figura 5.15: Remodelamento dos microtúbulos em miofibrila de C2C12 apresentando um cisto de *T. gondii*. Miofibrila após 216 h de infecção albergando um cisto, observado por DIC (A). Padrão de distribuição dos microtúbulos (em verde) sem alteração na célula infectada (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

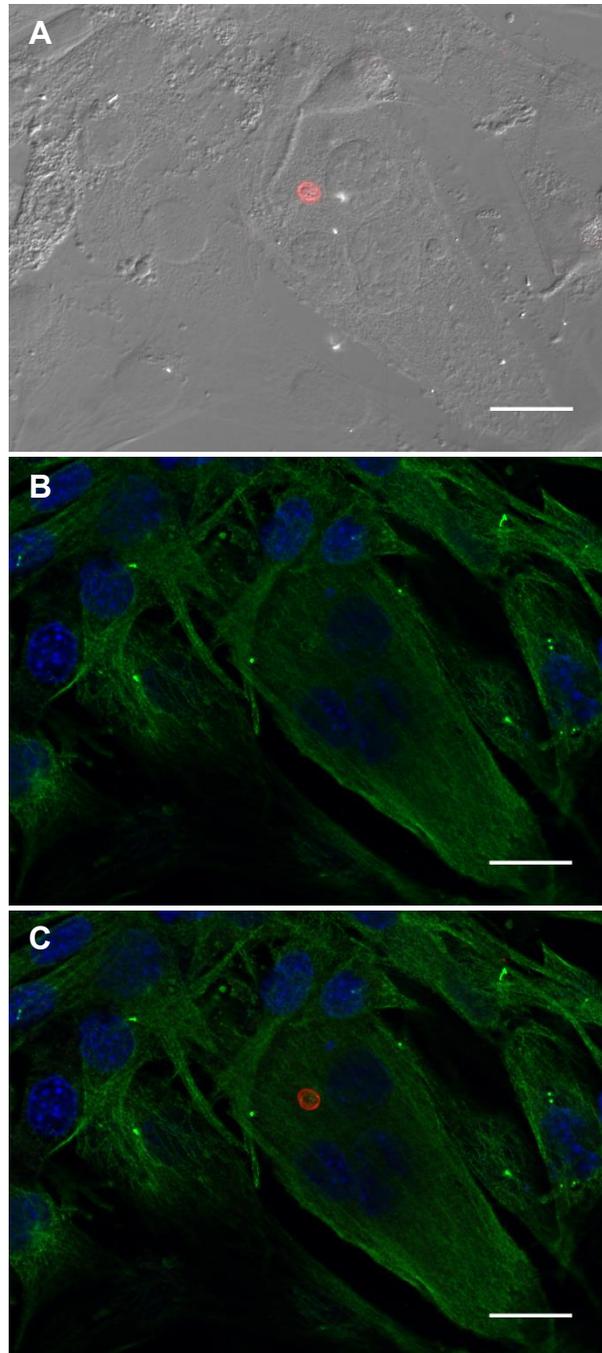


Figura 5.16: Organização dos microtúbulos em miofibrila contendo um cisto de *T. gondii*. DIC evidencia um miofibrila albergando um cisto (em vermelho) 216 após a infecção (A). Ausência de alteração na distribuição da β -tubulina (em verde) na miofibrila (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

O filamento intermediário alvo deste trabalho foi a desmina, proteína formadora de homopolímeros. A desmina é uma das primeiras proteínas músculo-específica a ser sintetizada, sendo detectada já em mioblastos. Nestas células mononucleadas não-infectadas, os filamentos de desmina migram da região próxima ao núcleo em direção à periferia celular (Figura 5.17 A e B). Após sua diferenciação em miócitos, células aptas à fusão, as CME demonstraram um novo padrão de distribuição da desmina: filamentos dispostos de forma paralela ao sarcolema (Figura 5.18 A e B). Este padrão foi mantido em miotubos/miofibras (Figura 5.19 A e B). Em células infectadas, após o estabelecimento da cistogênese de *T. gondii*, foi possível observar dois padrões distintos de alteração da distribuição dos filamentos de desmina: (i) remodelamento evidente da proteína em miotubos (Figuras 5.20 A-D, 5.21 A-C e 5.22 A-C), onde a detecção da proteína foi diminuída no entorno dos cistos teciduais e a desmina foi então concentrada na periferia (Figuras 5.20 A-D, 5.22 A e B) e/ou nas extremidades da célula hospedeira (Figuras 5.20 A-D, 5.21 A-C e 5.22 A-C), e (ii) ausência de alteração na organização estrutural dos filamentos em miofibras (Figuras 5.20 A-D, 5.23 A-D, 5.24 A-C e 5.25 A-C).

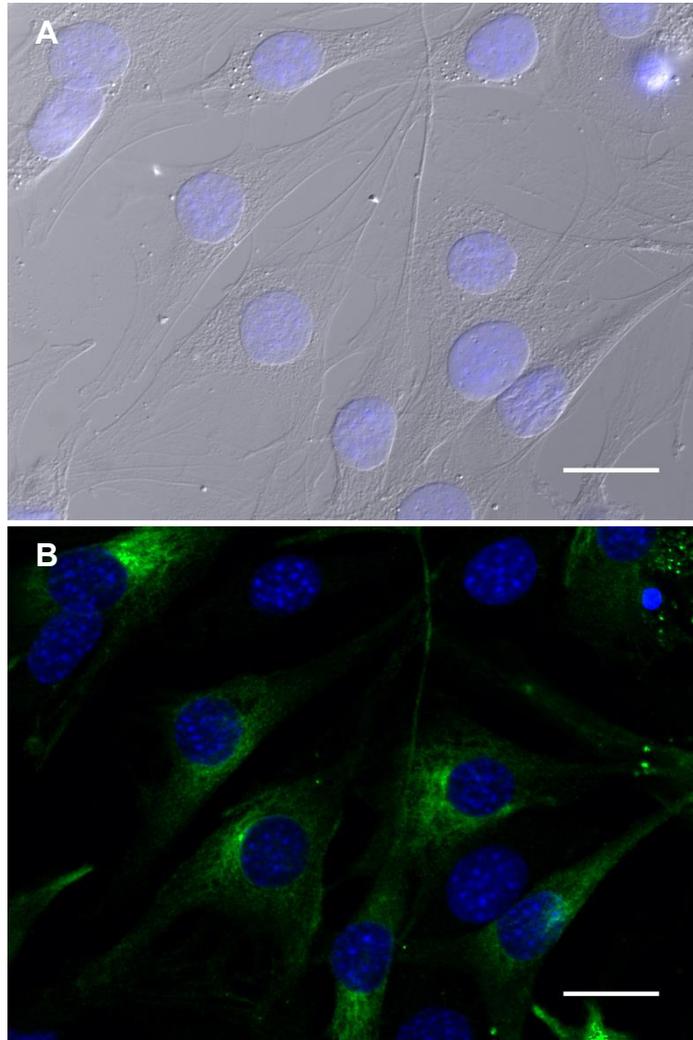


Figura 5.17: Filamentos de desmina em mioblastos sem infecção da linhagem celular C2C12. Células mononucleadas observadas por DIC (A). Homopolímeros de desmina (em verde) partindo da região nuclear em direção à periferia da célula, permitindo a identificação destas células como mioblastos (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

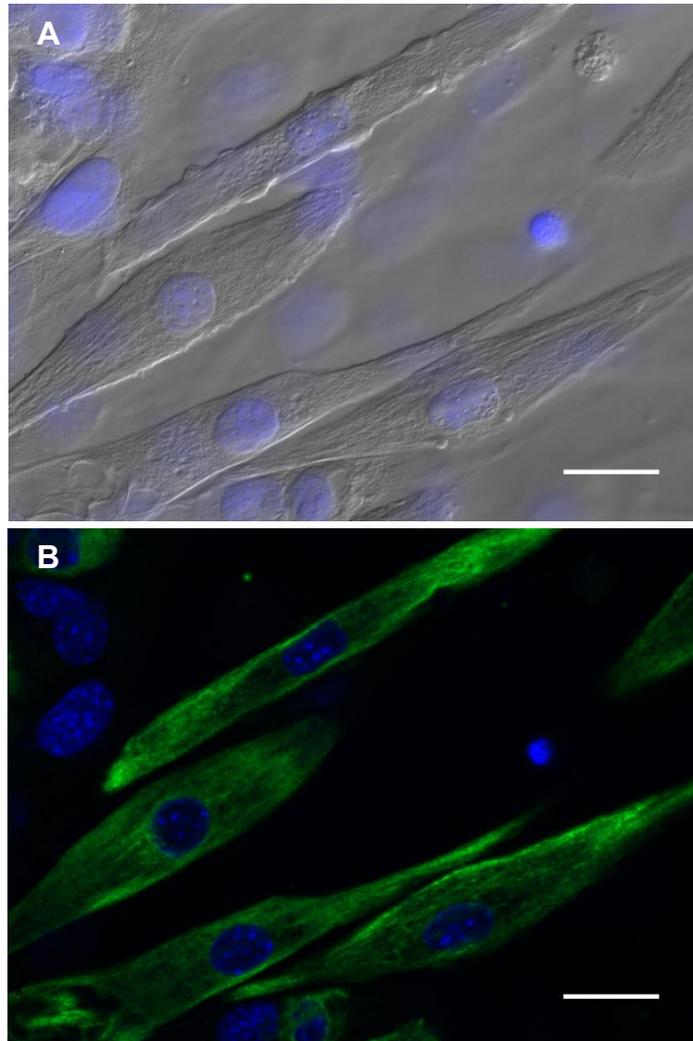


Figura 5.18: Distribuição dos filamentos de desmina em miócitos sem infecção da linhagem celular C2C12. DIC evidenciando células mononucleadas, alinhadas umas às outras (A). Filamentos de desmina (em verde) distribuídos paralelamente ao sarcolema, demonstrando o perfil de distribuição desta proteína encontrado em miócitos (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

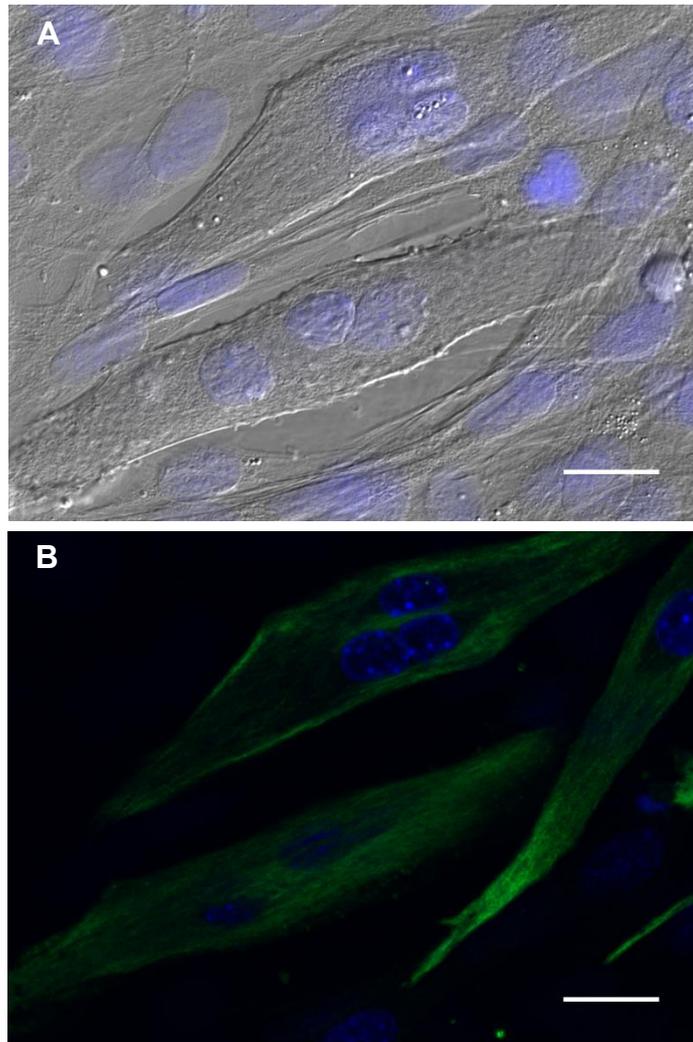


Figura 5.19: Organização dos filamentos de desmina em miotubos da linhagem celular C2C12. Miotubos observados por DIC (A). Padrão de distribuição dos filamentos de desmina (em verde) paralelo ao eixo principal da célula em miotubos. (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

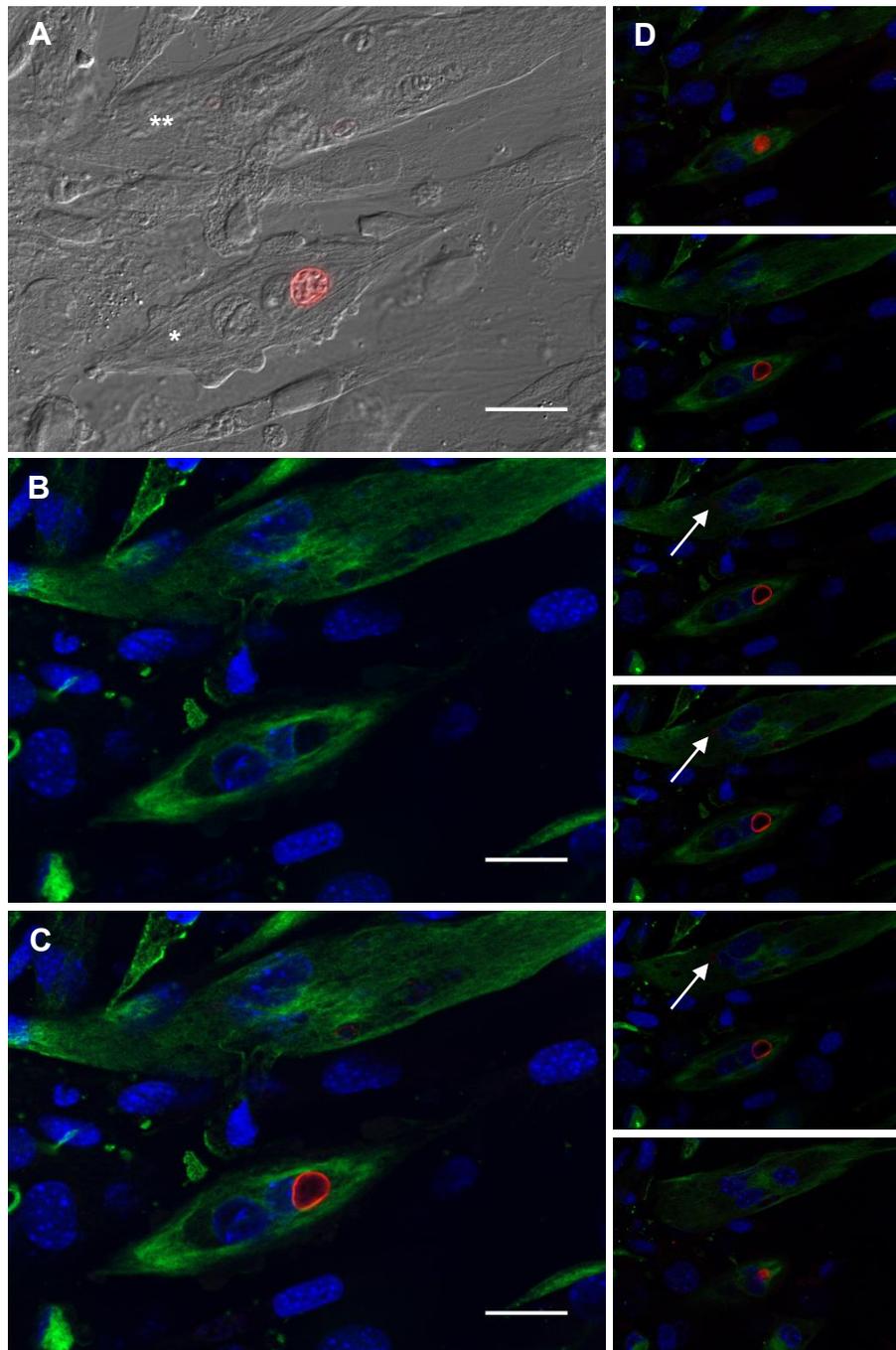


Figura 5.20: Padrões de disposição da desmina em miotubo e miofibrila de C2C12. Um miotubo (*) e uma miofibrila (**) contendo um cisto (em vermelho) após 168 h de infecção observados por DIC (A). Reestruturação evidente da desmina (em verde) no miotubo que alberga o cisto. A proteína foi redirecionada para as extremidades e periferia celular (B). Sobreposição de A e B (C). Cortes correspondentes a 0,25 μm /pixel do eixo Z permitindo observar que o rearranjo da desmina observado no miotubo contendo o cisto não ocorreu na miofibrila. VP em transição e um cisto (setas) na miofibrila (D). As imagens A e B correspondem ao 2º corte óptico. Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

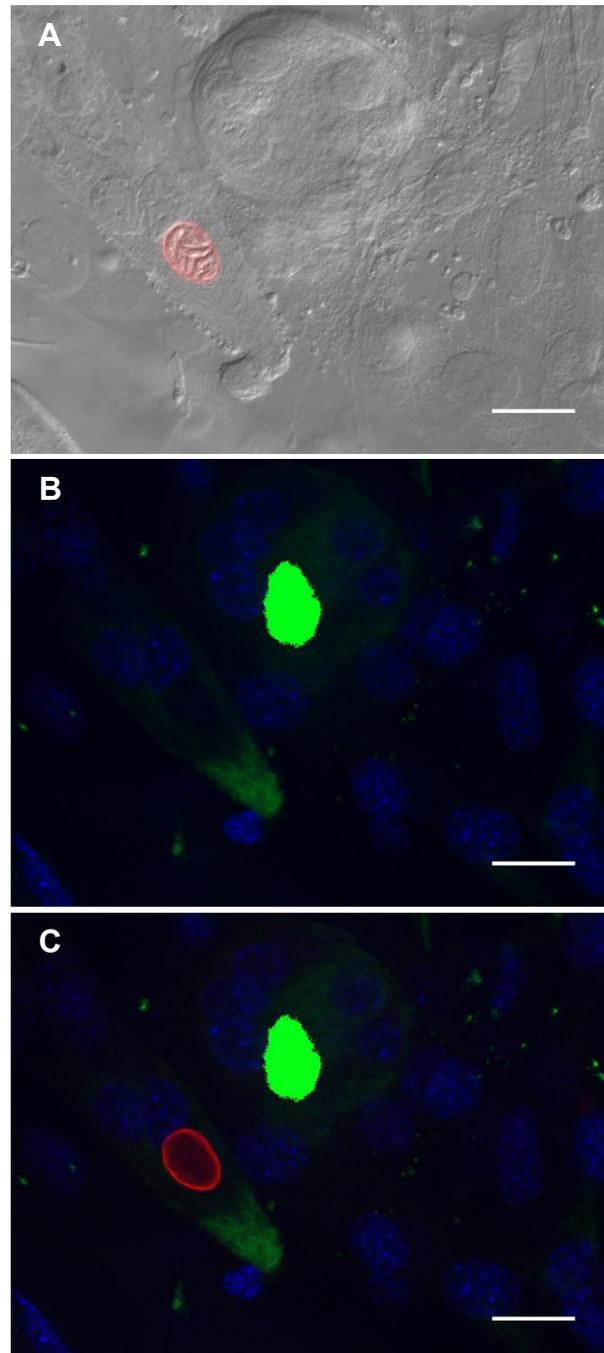


Figura 5.21: Remodelamento dos filamentos de desmina de C2C12 em miotubo apresentado um cisto de *T. gondii*. Miotubo após 216 h de infecção visto por DIC apresentando um cisto, evidenciado pela marcação da parede cística pela lectina DBA (em vermelho) (A). Célula infectada mostrando desmina (em verde) depositada na extremidade do miotubo (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

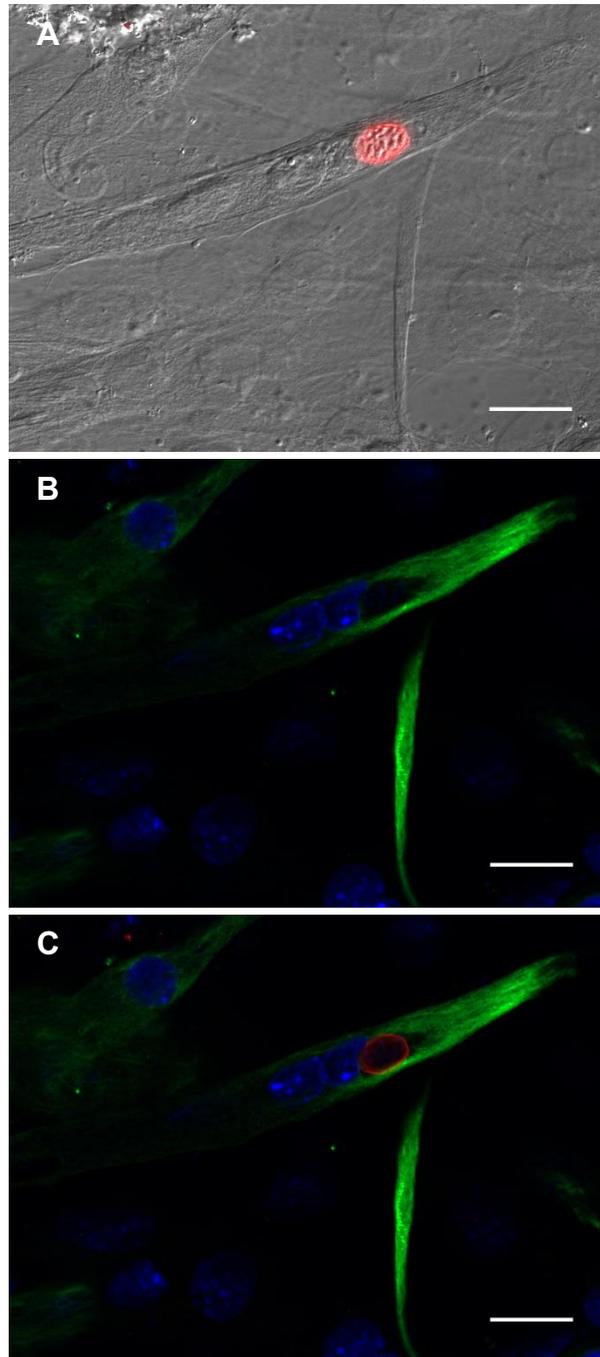


Figura 5.22: Alteração da distribuição da desmina de C2C12 em miotubo apresentando um cisto de *T. gondii*. DIC de um miotubo albergando um cisto (em vermelho) após 168 h de interação com o parasito (A). Reorganização da desmina (em verde) no miotubo infectado e deposição desta proteína na extremidade da célula hospedeira (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

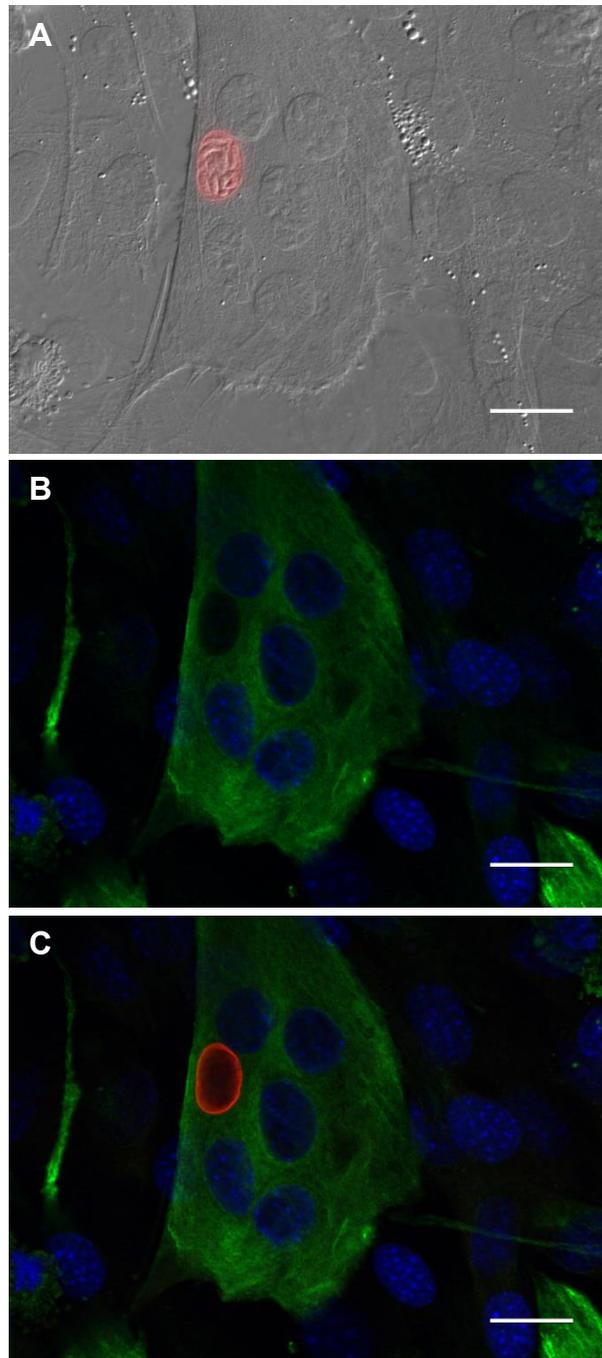


Figura 5.23: Disposição dos filamentos de desmina de C2C12 em miofibrila apresentando um cisto de *T. gondii*. Miofibrila vista por DIC e contendo um cisto no seu interior (em vermelho) após 216 h de interação com o parasito (A). Filamentos de desmina (em verde) na célula infectada sem alteração (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

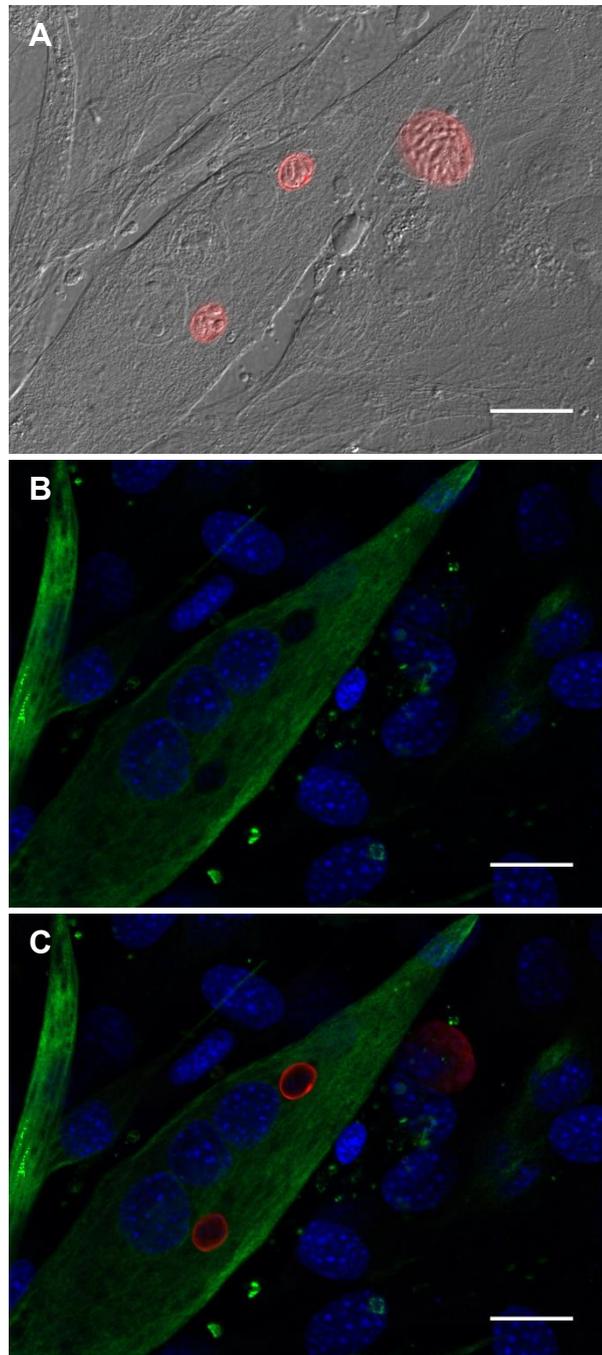


Figura 5.24: Filamentos de desmina de C2C12 em miofibra apresentado dois cistos de *T. gondii*. DIC mostrando miofibra infectada, contendo dois cistos (em vermelho) após 168 h de infecção (A). Filamentos de desmina (em verde) da célula infectada sem alteração pela presença dos cistos (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

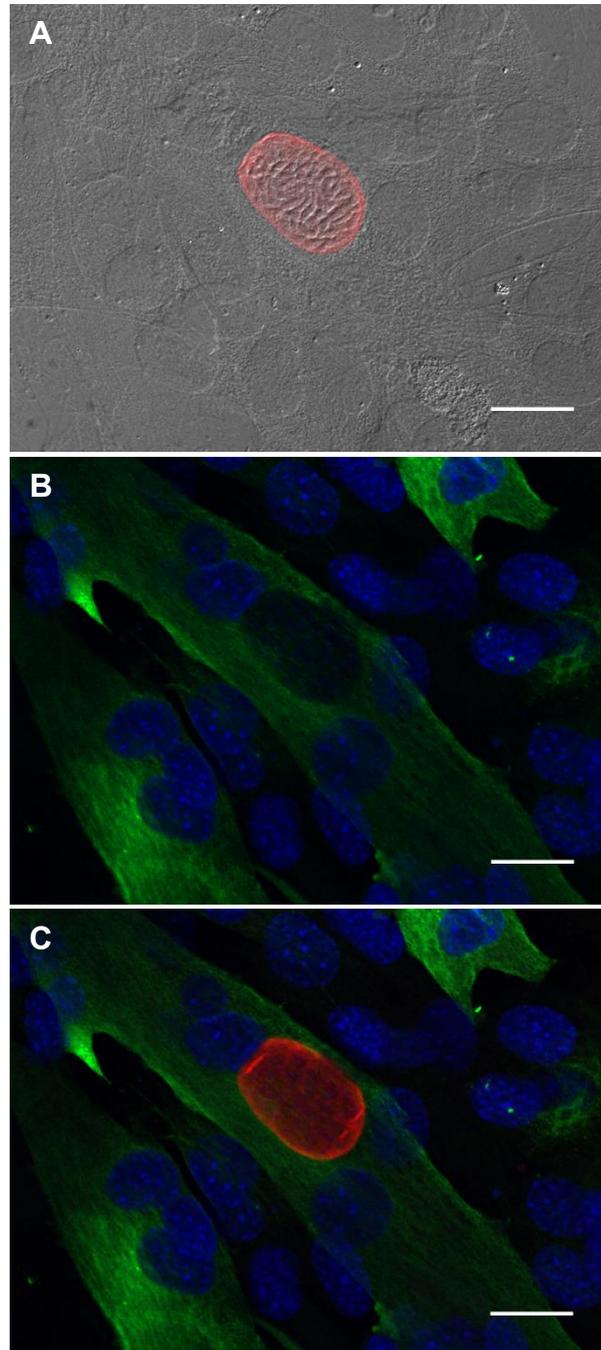


Figura 5.25: Filamentos de desmina de C2C12 em miofibra apresentado um cisto de *T. gondii*. Miofibra evidenciada por DIC apresentando um cisto (em vermelho) após 216 h de interação com o parasito (A). Distribuição da desmina (em verde) na célula infectada sem alteração (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

A proteína acessória miosina apresenta diferentes classes de moléculas que estão diretamente envolvidas em muitos processos celulares, sendo a classe II responsável pela contração muscular. Para a avaliação tanto de células mononucleadas quanto de células multinucleadas, utilizamos um anticorpo que reconhece ambas as cadeias pesada e leve da miosina da CME. Por esta razão, o padrão estriado característico da fibra muscular não pôde ser revelado. A distribuição da miosina da CME foi semelhante em células mononucleadas e miotubos (Figuras 5.26 A e B e 5.27 A e B) e não foi modificada quando estas células albergam cistos teciduais, independentemente do grau de diferenciação da célula hospedeira (Figuras 5.28 A-C e 5.29 A-C). Células mononucleadas muito parasitadas contendo vacúolos não apresentaram alterações perceptíveis na organização de filamentos de miosina (Figura 5.30 A-C).

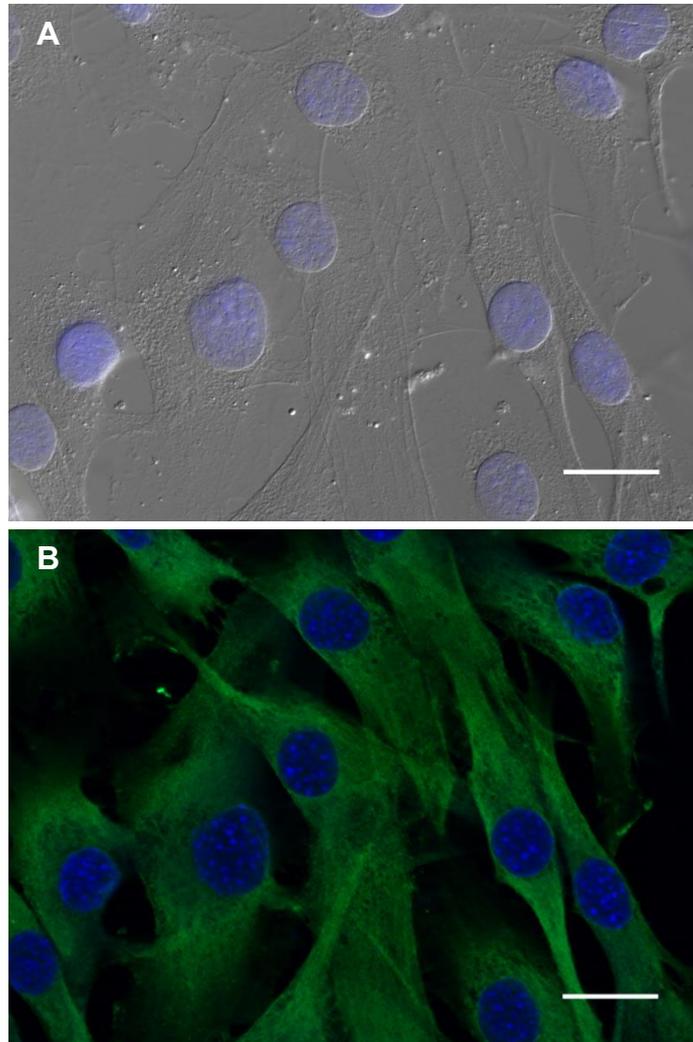


Figura 5.26: Organização da miosina de C2C12 em células mononucleadas sem infecção. Cultura de C2C12 indiferenciada vista por DIC, apresentando células mononucleadas (A). Distribuição da miosina (em verde) por todo o citoplasma (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

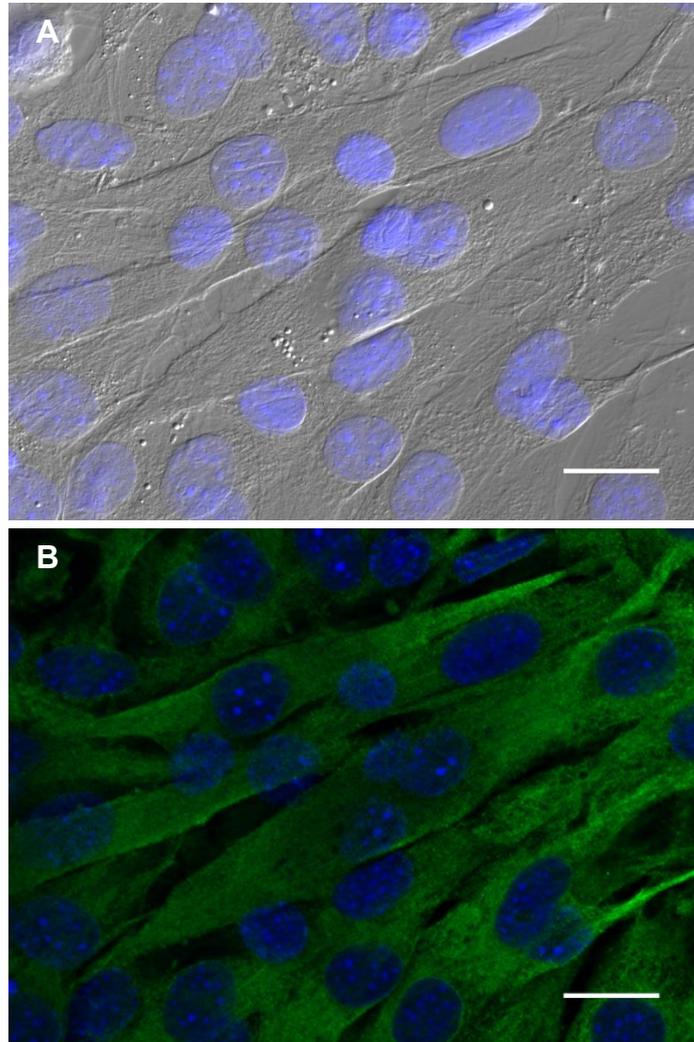


Figura 5.27: Organização da miosina de C2C12 em miotubos sem infecção. DIC mostrando células mononucleadas e miotubos presentes na cultura de C2C12 diferenciada (A). Miotubo mostrando o mesmo padrão de distribuição da miosina (em verde) da célula mononucleada (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

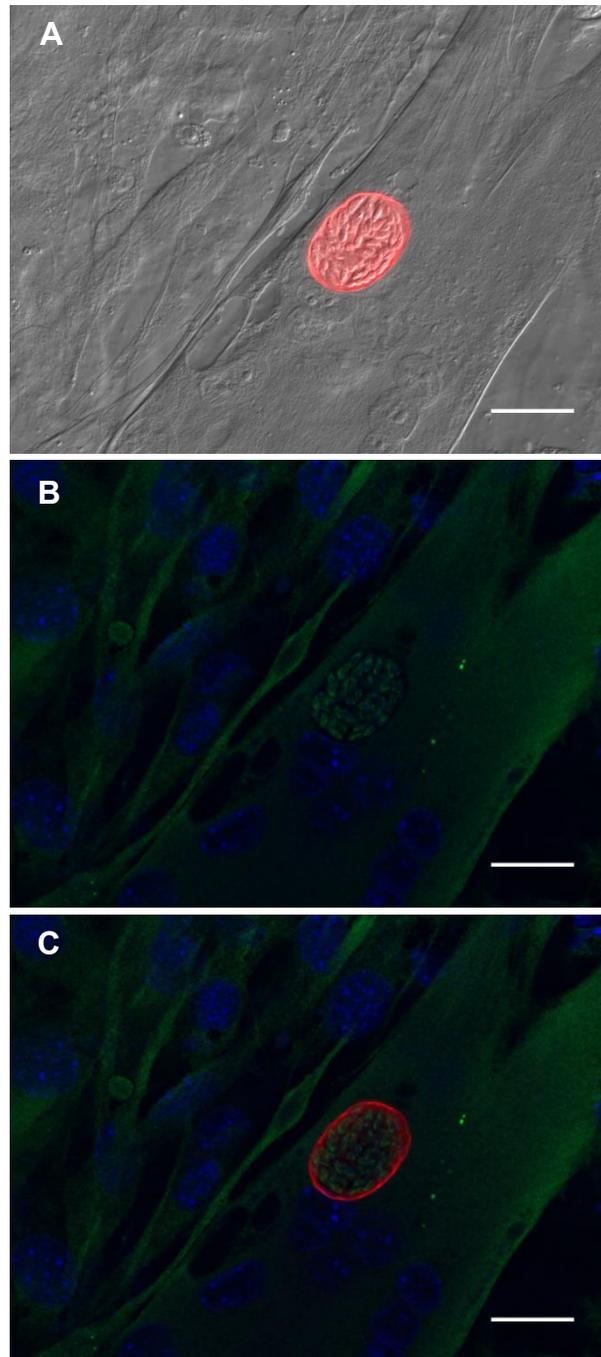


Figura 5.28: Padrão de distribuição da miosina na miofibrila de C2C12 contendo um cisto de *T. gondii*. Cultura diferenciada vista por DIC, apresentando uma miofibrila albergando um cisto (em vermelho) e células mononucleadas após 216 h de infecção(A). Célula infectada mostrando miosina (em verde) sem modificação na sua organização (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Sobreposição de A e B (C). Barra: 20 μm

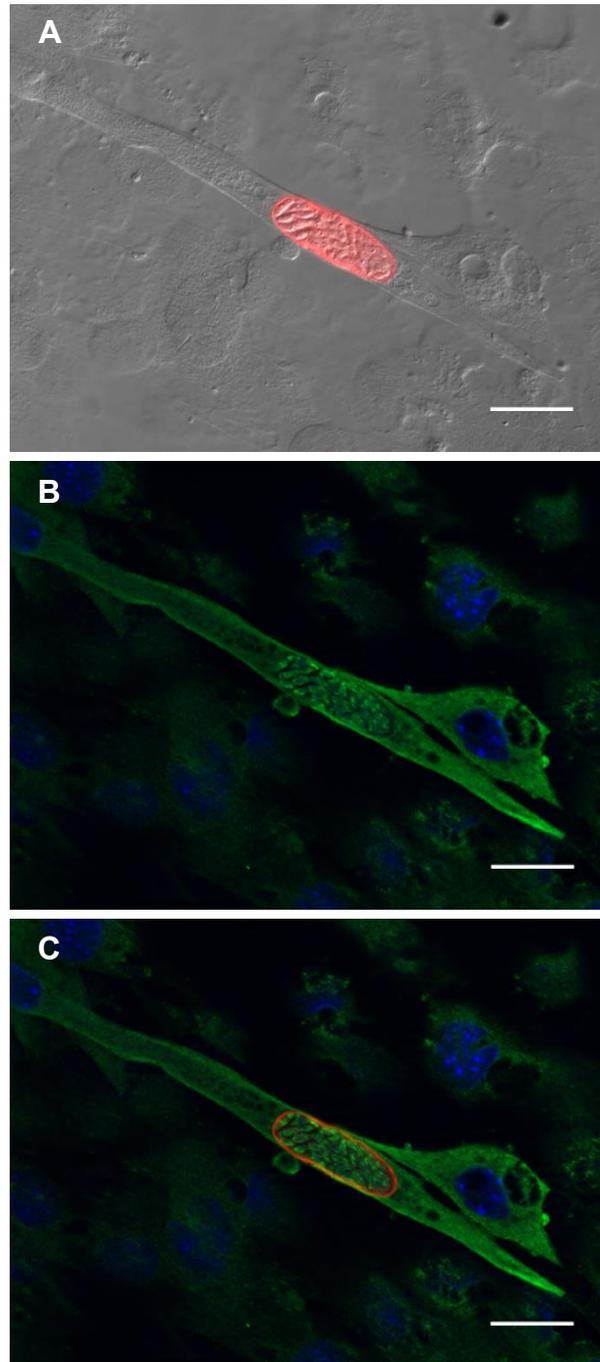


Figura 5.29: Revelação de miosina em C2C12 mononucleada contendo um cisto de *T. gondii*. Células mononucleadas evidenciadas pelo DIC, uma delas apresentando um cisto tecidual (em vermelho) em seu interior após 216 h de infecção (A). Distribuição da miosina (em verde) na célula infectada não sofreu alteração (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Sobreposição de A e B (C). Barra: 20 μ m

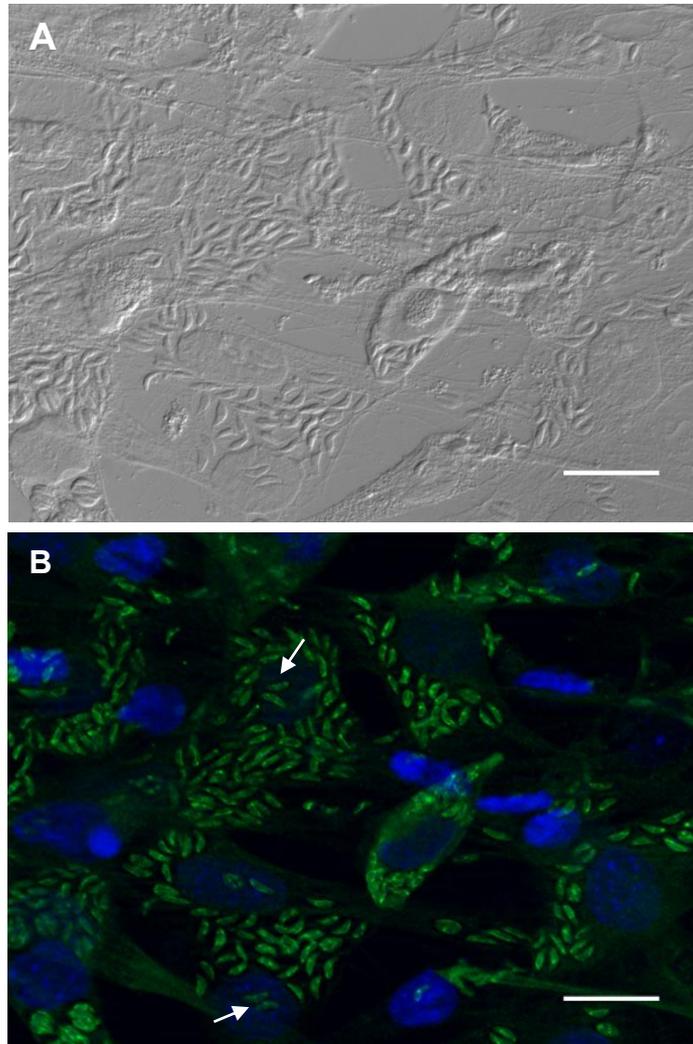


Figura 5.30: Revelação de miosina em C2C12 mononucleadas contendo VP de *T. gondii* em processo avançado de ciclo lítico. Células mononucleadas observadas por DIC evidenciando a presença de vários parasitos no interior dos VP após 168 h de interação (A). Distribuição da miosina (em verde) nas células infectadas sem alteração perceptível. O plano de corte da imagem evidenciou a presença de parasitos no núcleo da célula hospedeira (setas) (B). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

A proteína acessória do citoesqueleto, plectina, é responsável pela ligação e ancoragem da rede de filamentos de desmina às organelas e complexos juncionais, sendo expressa como múltiplas isoformas que apresentam distribuição celular diferencial. No entanto, neste trabalho avaliamos a plectina sem diferenciar suas isoformas. A distribuição desta proteína em culturas controle (não-infectadas) foi homogênea por todo o citoplasma da CME. Contudo, como miotubos/miofibras derivam da fusão de miócitos, as células diferenciadas apresentaram maior quantidade de plectina em seu citoplasma quando comparada com as células mononucleadas (Figura 5.31 A e B).

Em miotubos infectados foi observado um rearranjo discreto da plectina ao redor do VP em processo de transição para cistos teciduais (Figuras 5.32 A-C e 5.33 A-C). Distribuição semelhante da plectina foi encontrada em células mononucleadas apresentando tanto VP clássicos (contendo taquizoítos no seu interior) quanto VP em transição para cistos (contendo formas em transição para bradizoítos) ou mesmo estruturas císticas (Figuras 5.34 A-C e 5.35 A-C). Quando cistos de *T. gondii* foram detectados em miotubos, observou-se um rearranjo da plectina no entorno destas estruturas, apresentando um perfil de marcação pontual e organizada ao redor do cisto (Figuras 5.36 A-C e 5.37 A-C).

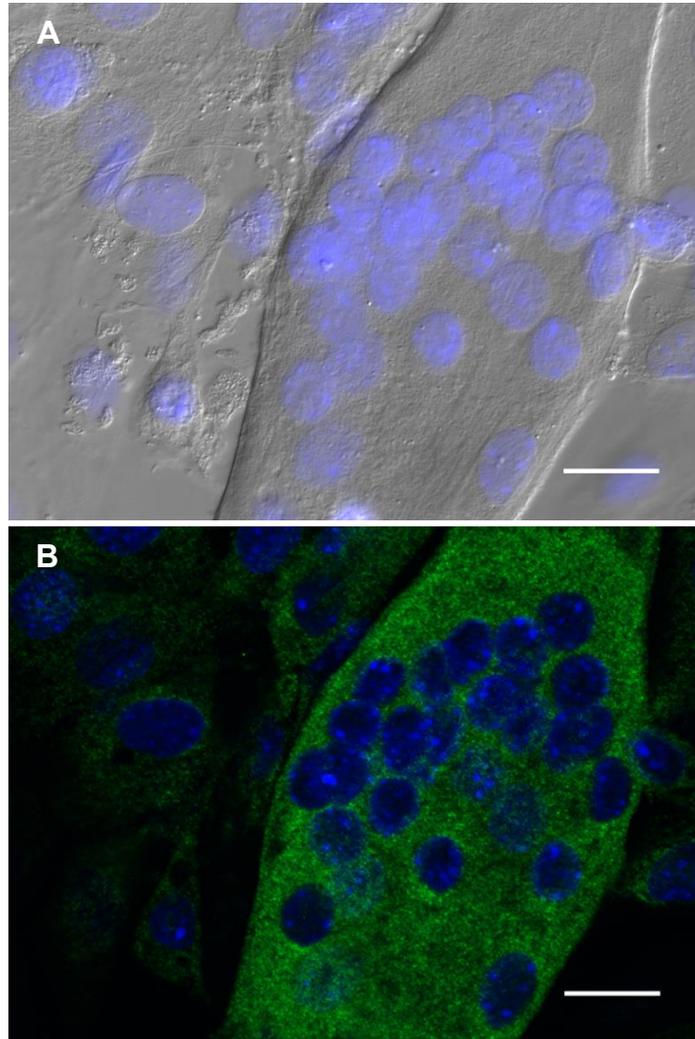


Figura 5.31: Padrão de distribuição da plectina em células C2C12 não-infectadas. Cultura de C2C12 diferenciada vista por DIC, apresentando uma miofibrila e células mononucleadas (A). Plectina (em verde) distribuída por todo o citoplasma, em maior quantidade em miotubos/miofibrilas que em células mononucleadas (B). Núcleos foram visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

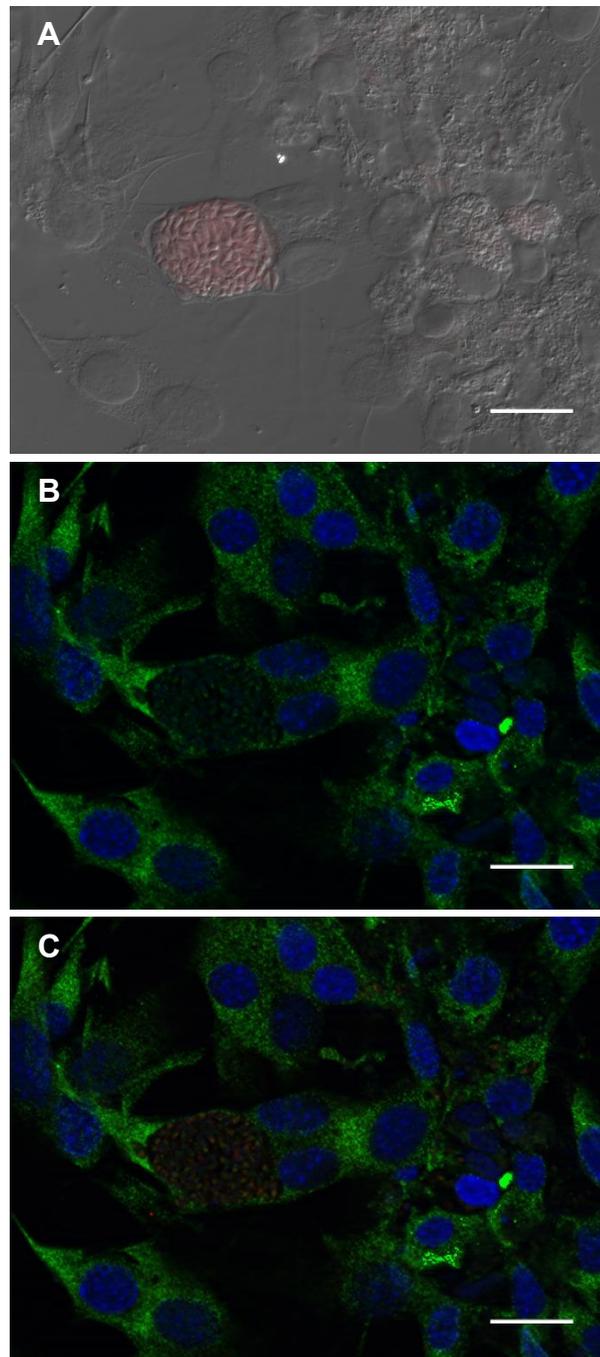


Figura 5.32: Redistribuição da plectina de C2C12. Vacúolo de *T. gondii* em vias de diferenciação detectado fracamente pela DBA (em vermelho) e observado por DIC no interior de um mitotubos após 168 h de interação (A). Plectina (em verde) concentrada ao redor do VP em transição (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

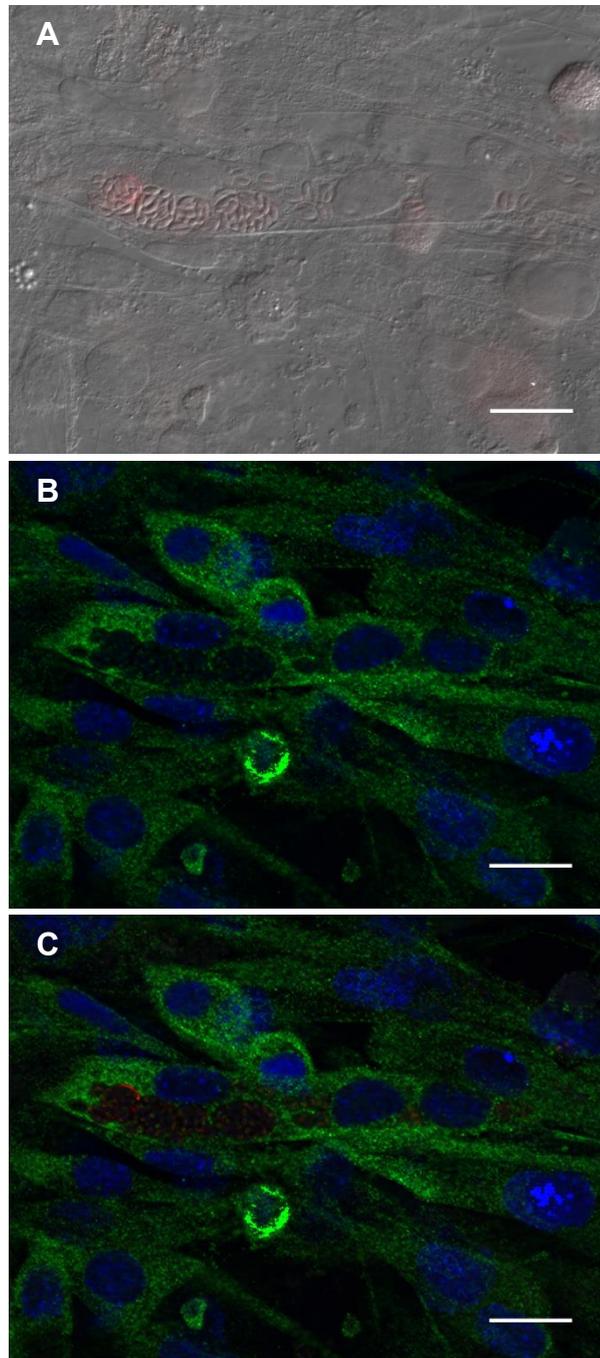


Figura 5.33: Revelação de plectina ao redor do VP de *T. gondii* em processo de transição para cisto no interior da C2C12. DIC demonstrando um miotubo contendo vários VP em transição (em vermelho) 168 h após a infecção (A). Plectina (em verde) com o mesmo padrão de redistribuição das figuras anteriores (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos foram visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

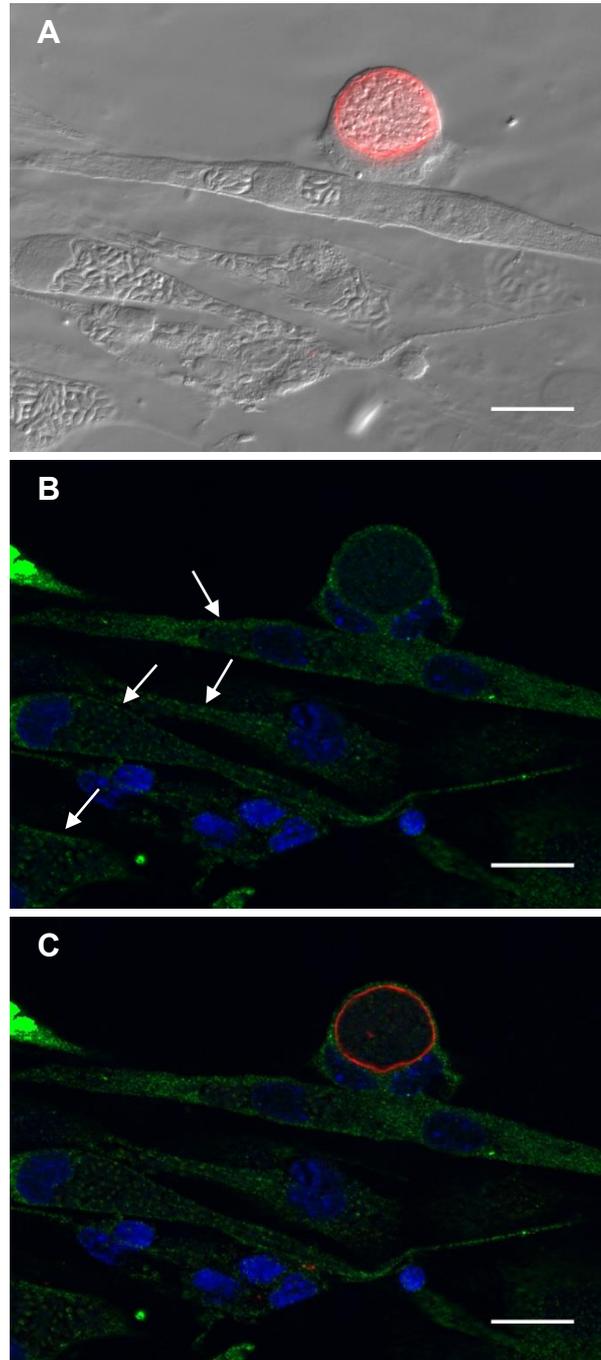


Figura 5.34: Reorganização da plectina da C2C12. Células após 216 h de infecção vistas por DIC. Na imagem é possível observar um miotubo contendo um cisto (em vermelho) e um miotubo e células mononucleadas com VP (A). Distribuição da plectina (em verde) envolvendo o cisto igual ao observado ao redor dos VP (setas), tanto no miotubo quanto nas células mononucleadas (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μm

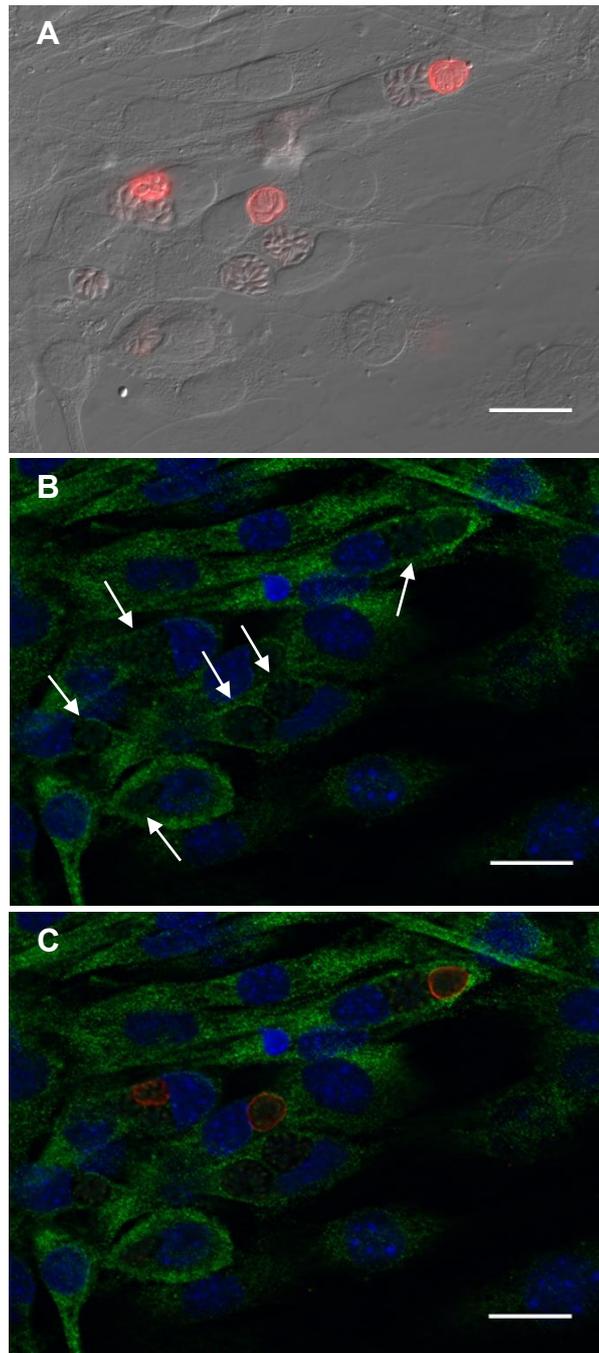


Figura 5.35: Distribuição da plectina em C2C12 mononucleadas contendo VP em transição e cistos de *T. gondii*. Células mononucleadas vistas por DIC, apresentando três cistos (em vermelho) e sete vacúolos em transição com fraca marcação pela lectina DBA, após 216 h de interação (A). Concentração da da plectina (em verde) da CME infectada ao redor de ambas as estruturas do parasito, cistos e vacúolos em transição (setas) (B), como demonstrado nas figuras anteriores. Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

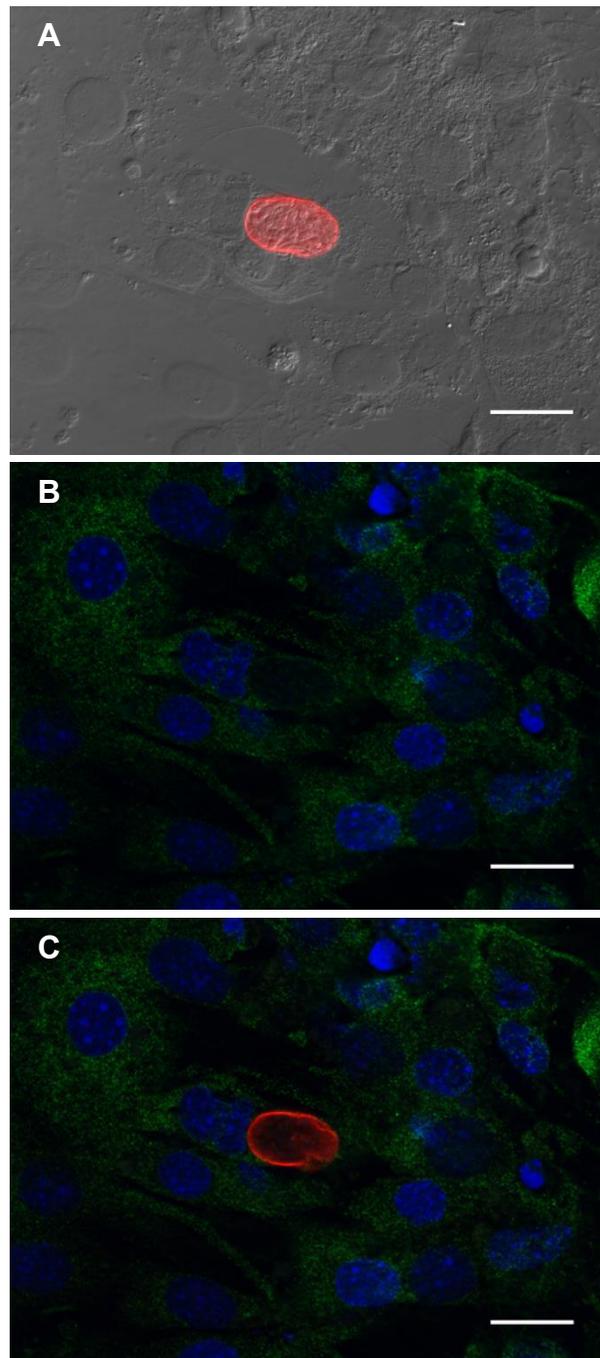


Figura 5.36: Reorganização da plectina de C2C12 quando há infecção pelo *T. gondii*. DIC mostrando um miotubo 168 h após a infecção albergando um cisto, evidenciado pela marcação da parede cística pela lectina DBA (em vermelho) (A). Redistribuição da plectina (em verde) da célula infectada ao redor do cisto (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

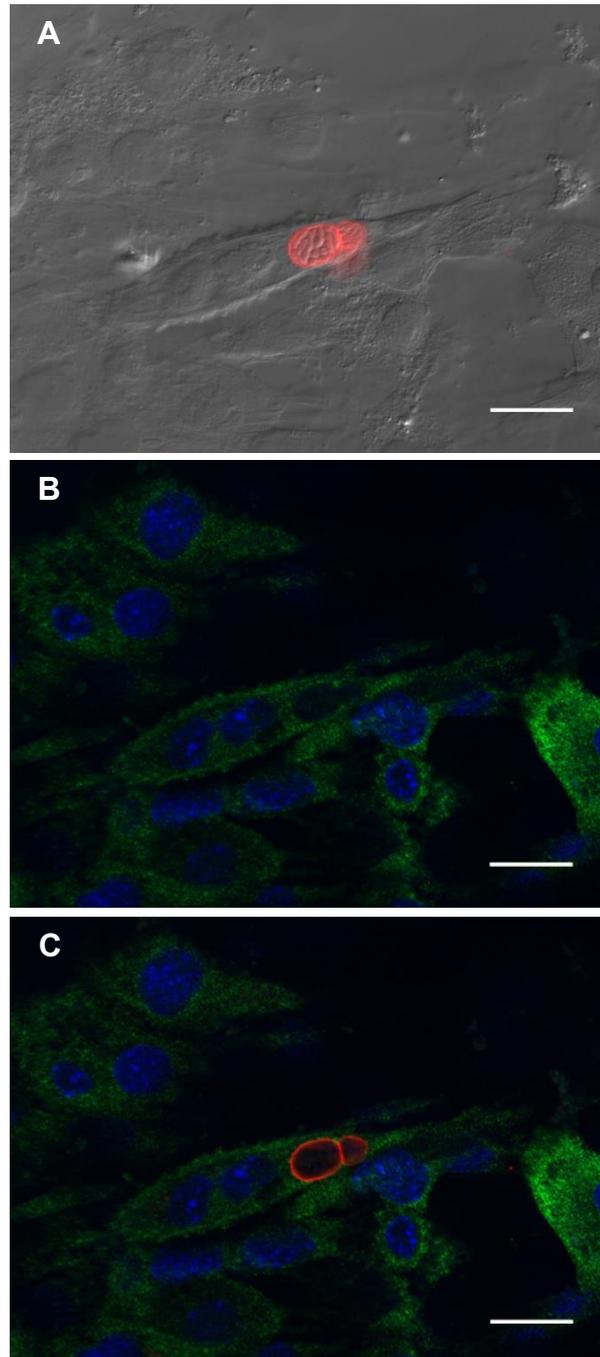


Figura 5.37: Reestruturação da plectina de C2C12 ao redor de dois cistos de *T. gondii*. Após 216 h de interação, a CME diferenciada é identificada como miotubo por apresentar dois núcleos evidenciados pelo DIC, enquanto os cistos são detectados pela DBA (em vermelho) (A). Rearranjo da plectina (em verde) da célula infectada ao redor das estruturas císticas (B). Sobreposição de A e B (C). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul). Barra: 20 μ m

5.3 Análise estrutural da distribuição das proteínas do citoesqueleto em células Vero durante a cistogênese de *T. gondii*

Os filamentos de actina da célula epitelial renal Vero foram avaliados durante a cistogênese de *T. gondii*. Inicialmente, o perfil de distribuição dos filamentos de actina foi analisado em culturas controle, compostas por células não-infectadas. Estas células apresentaram estes filamentos distribuídos através de todo o seu citoplasma, sendo sua maior concentração na região imediatamente abaixo da membrana plasmática e nos pontos de adesão focal ao substrato (Figura 5.38 A-C). Apesar da utilização da microscopia de fluorescência de campo amplo com iluminação estruturada (ApoTome) e subsequente captura da informação de imagem sem ruído, proveniente do plano focal, não foi possível detectar qualquer alteração no padrão organizacional dos microfilamentos de actina nas células infectadas apresentando tanto VP em transição (Figuras 5.39 A-D e 5.40 A-D) quanto cistos teciduais (Figuras 5.41 A-D, 5.42 A-D e 5.43 A-D). Contudo, esta ferramenta de análise permitiu a detecção de F-actina no cisto de *T. gondii* em alguns planos capturados no eixo Z (Figuras 5.42 A-D e 5.43 A-D).

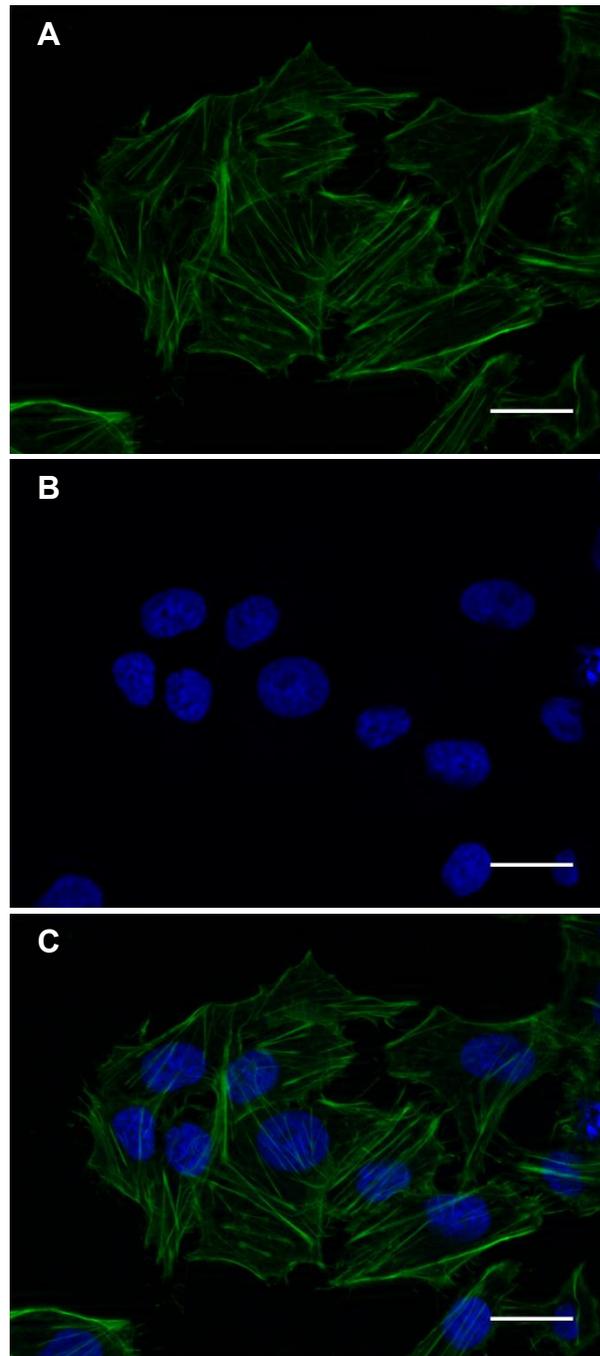


Figura 5.38: Organização estrutural dos microfilamentos de actina na célula epitelial renal Vero sem infecção. Filamentos de actina (em verde) distribuídos por todo o citoplasma, porém, mais concentrados na região abaixo da membrana plasmática e nos pontos de adesão focal (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Sobreposição de A e B (C). Barra: 20 μm

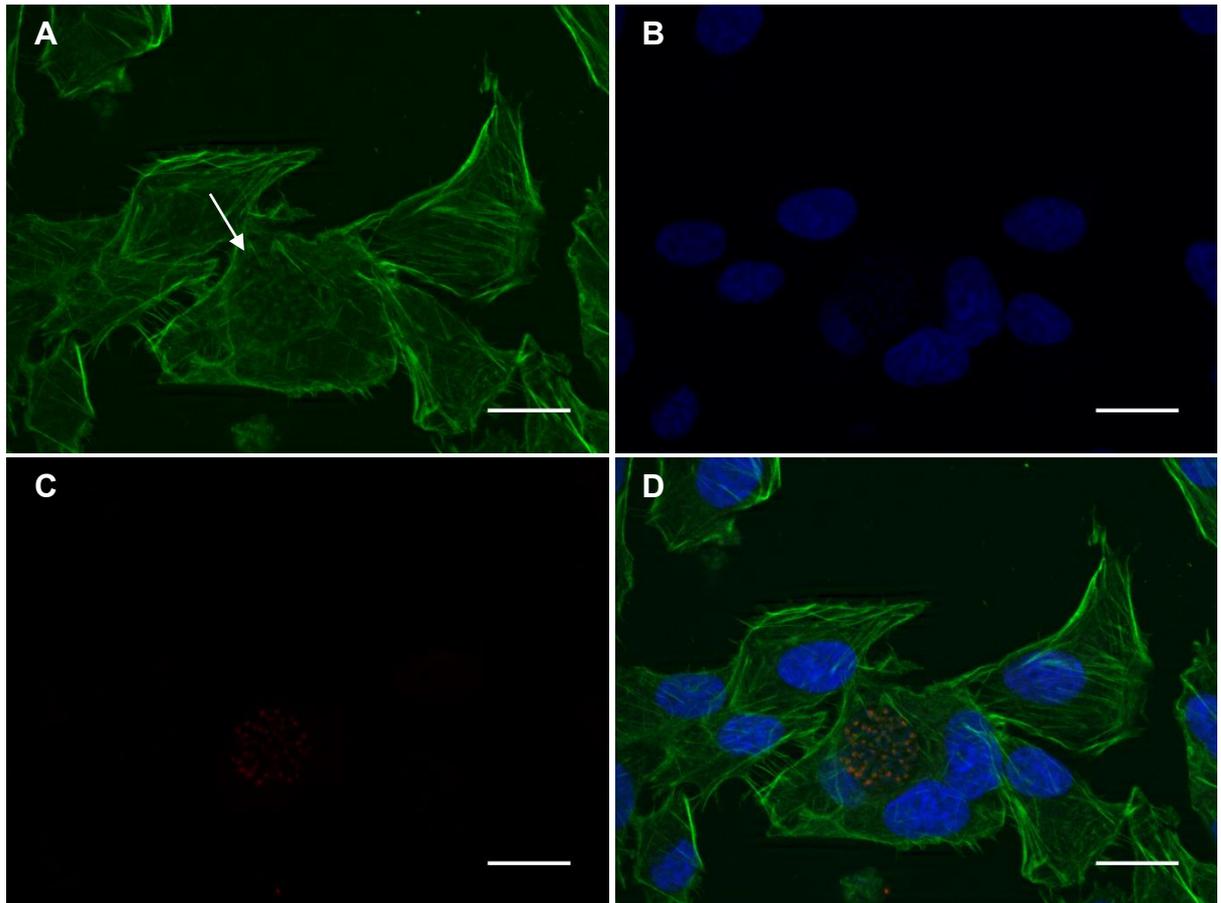


Figura 5.39: Distribuição dos filamentos de actina na célula Vero 120 h após a infecção com *T. gondii*. Microfilamentos (em verde) da célula infectada sem alteração apresentando um VP em transição (seta) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição apresentando marcação com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 20 μ m

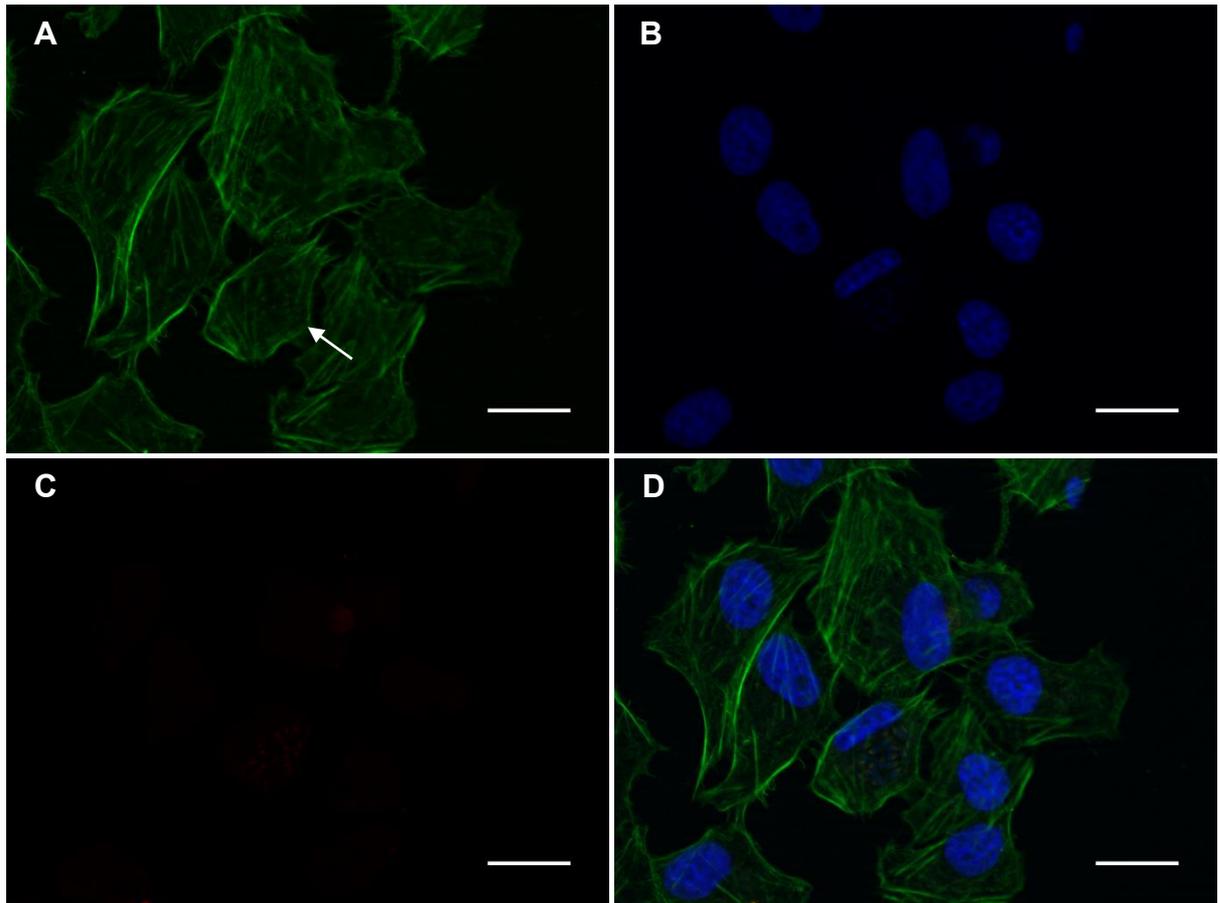


Figura 5.40: VP de *T. gondii* em transição no interior de uma célula Vero. Célula após 72 h de interação apresentando um cisto (seta), sem remodelamento dos filamentos de actina (em verde) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição marcado com a lectina DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 20 μ m

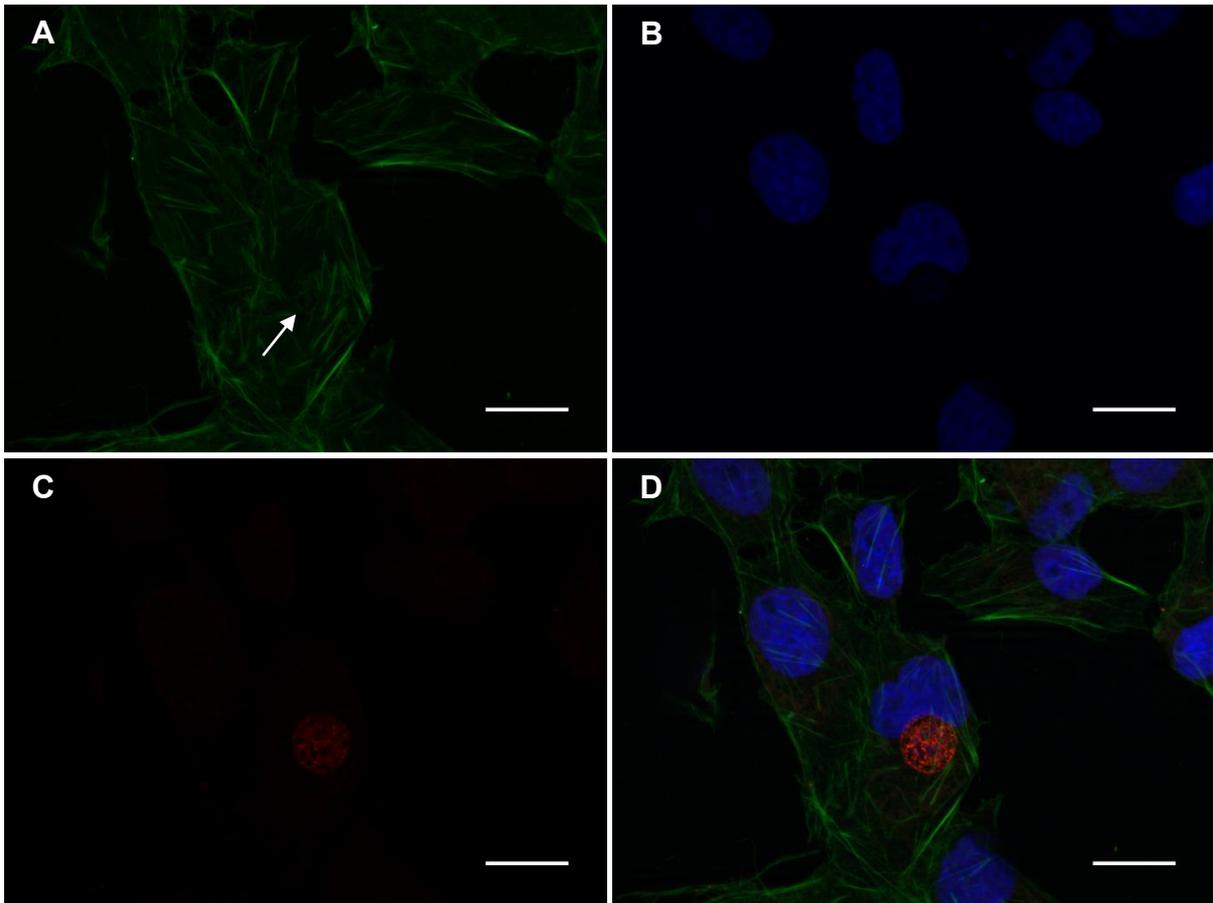


Figura 5.41: Perfil de distribuição dos microfilamentos de actina da célula Vero 72 após a infecção. Filamentos de actina sem alteração (em verde) da célula infectada apresentando um cisto (seta) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto marcado com a lectina DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 20 μ m

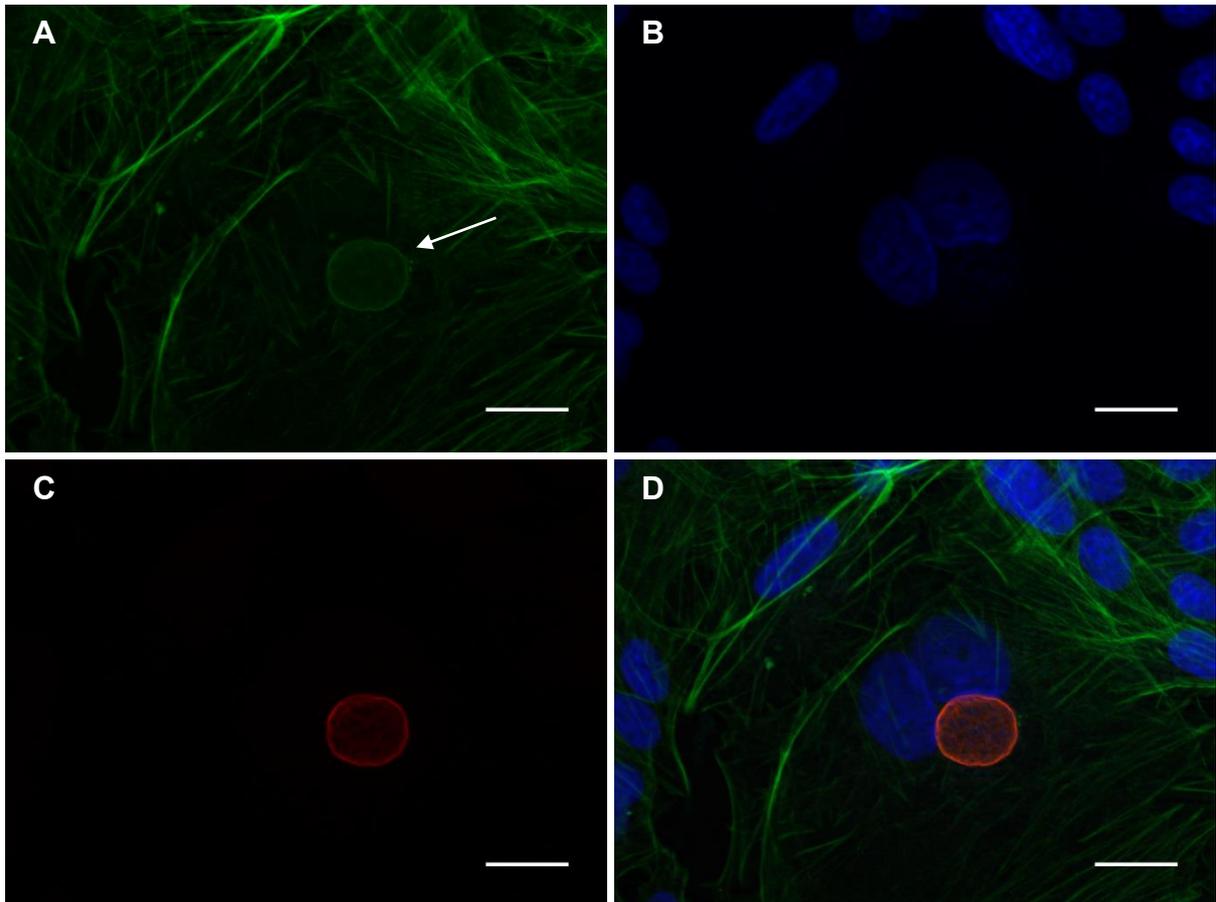


Figura 5.42: Marcação para filamentos de actina no cisto de *T. gondii* no interior da célula Vero. Marcação da F-actina na célula e na superfície do cisto (seta). Célula após 120 h de infecção sem nenhuma alteração no perfil de distribuição dos filamentos de actina (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto detectado pela lectina DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 20 μ m

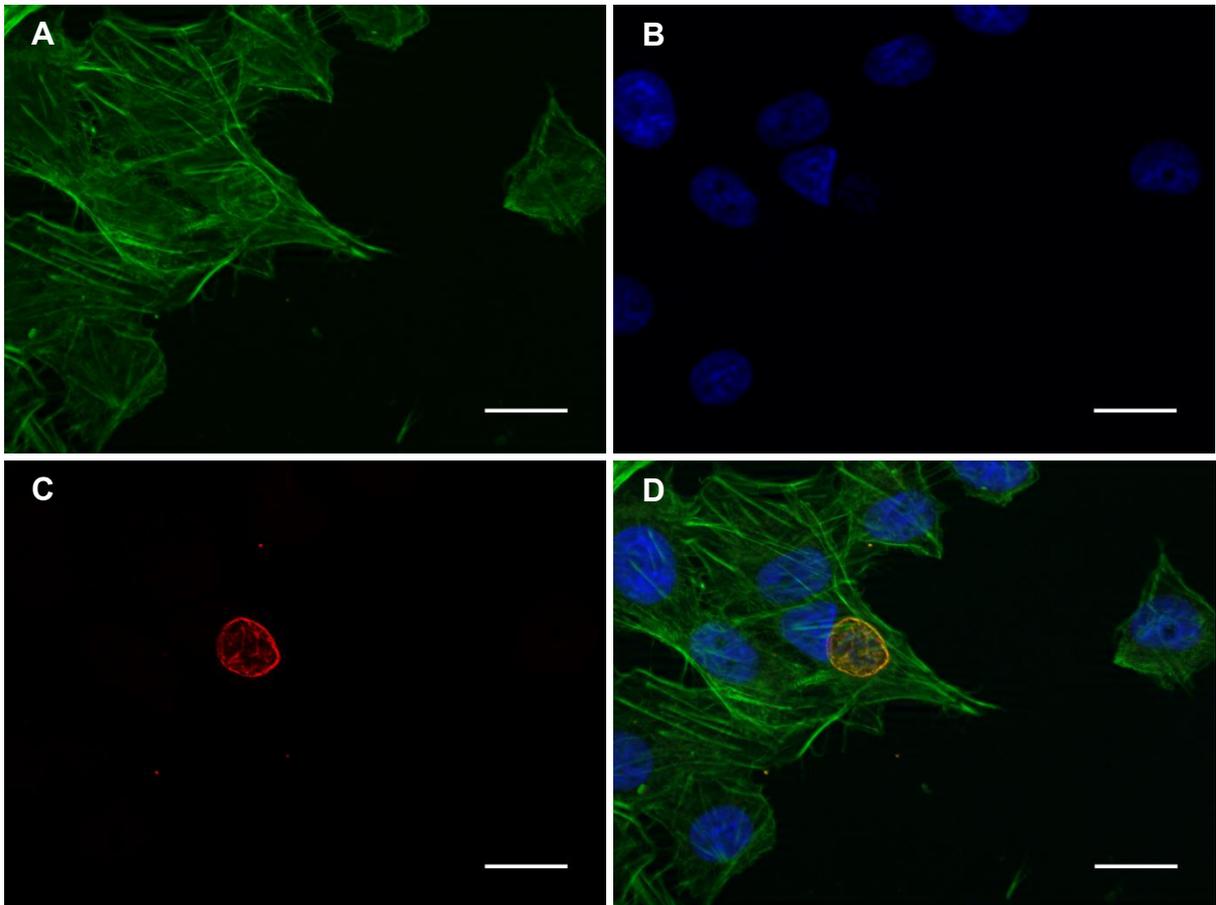


Figura 5.43: Perfil de distribuição dos filamentos de actina da célula Vero e marcação para a F-actina no cisto de *T. gondii*. Cisto de *T. gondii* com a presença de F-actina (seta) no interior da célula Vero, a qual não mostra modificação na organização dos filamentos de actina, 120 h após a infecção (em verde) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto evidenciado pela reação com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 20 μ m

A análise dos microtúbulos das células Vero, não-infectadas, revelou sua distribuição a partir da região nuclear para toda a célula (Figura 5.44). Além disso, a revelação da β -tubulina permitiu a visualização de regiões de justaposição entre as células destas culturas, uma das características mais marcantes do tecido epitelial (Figura 5.44 A-C). O estabelecimento da infecção por *T. gondii* neste tipo celular foi evidenciado pela presença de VP. Na região da célula hospedeira onde VP foram encontrados não foi observado nenhum tipo de modificação no padrão de distribuição dos microtúbulos (Figura 5.45 A-C). O mesmo resultado foi demonstrado quando estes VP continham parasitos em processo de diferenciação taquizoíto-bradizoíto para formação do cisto tecidual (Figura 5.46 A-D). No entanto, após o estabelecimento da cistogênese, ocorreu remodelamento dos microtúbulos da célula Vero ao redor das estruturas císticas, sendo a quantidade de β -tubulina acumulada variável de uma célula infectada para outra (Figuras 5.47 A-D, 5.48 A-D e 5.49 A-D).

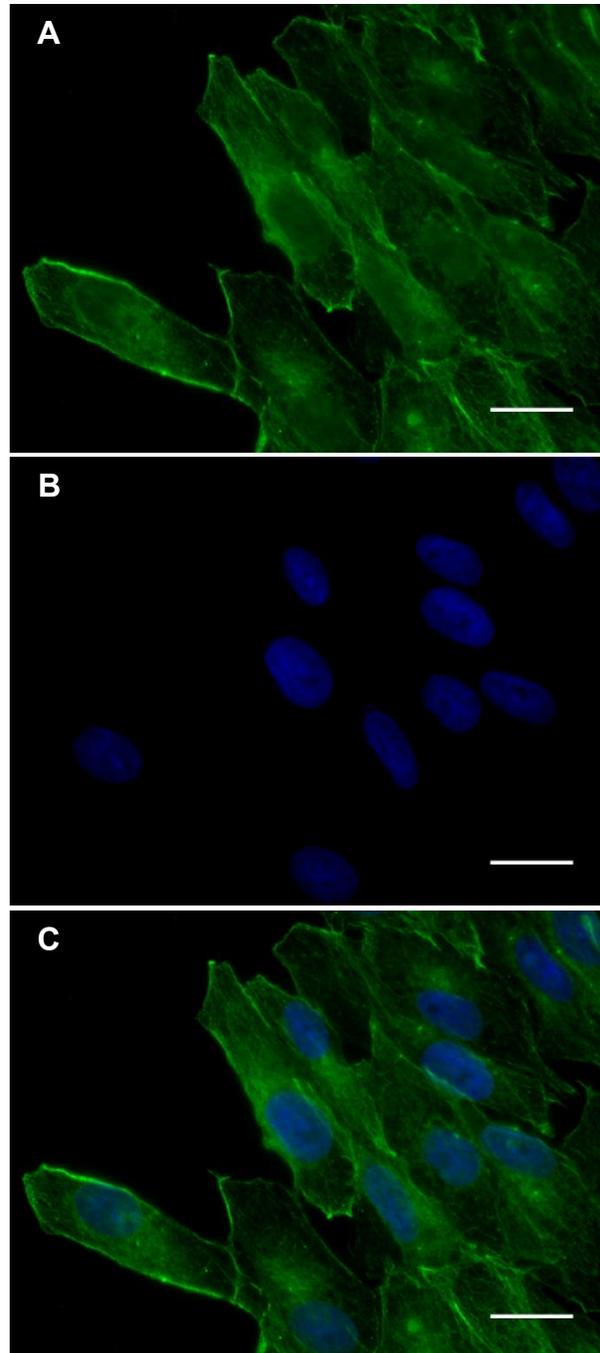


Figura 5.44: Organização estrutural dos microtúbulos na célula Vero não-infectada. Microtúbulos (em verde) distribuídos da região nuclear para a periferia revelando a justaposição destas células em cultura (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Sobreposição de A e B (C). Barra: 20 μm

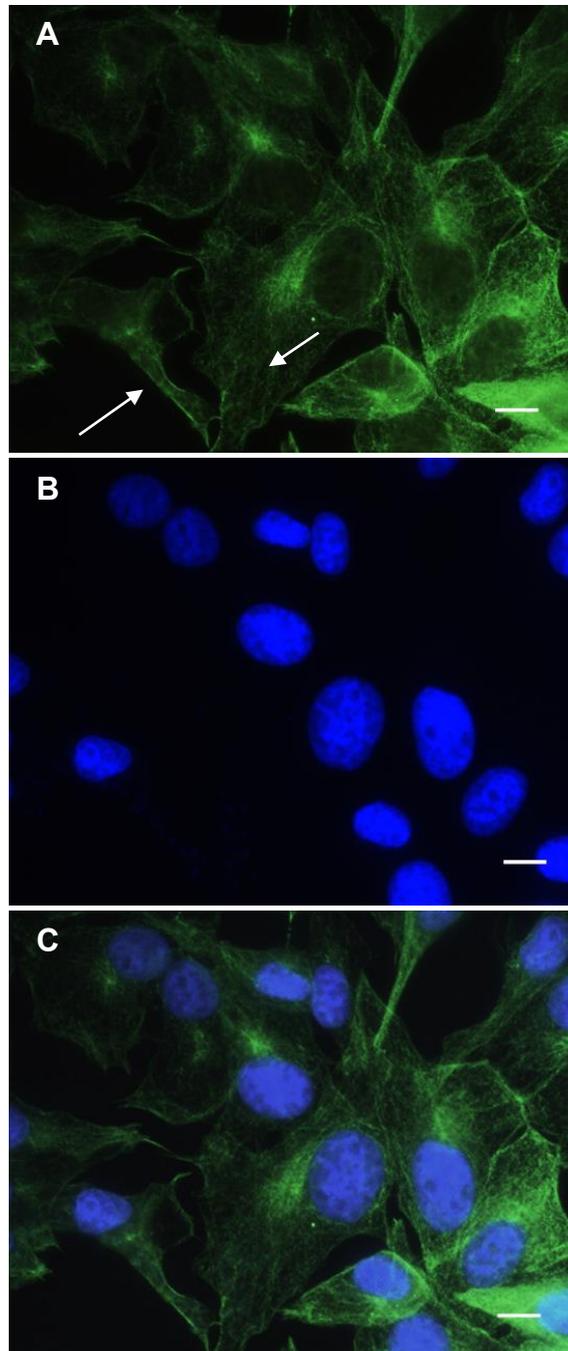


Figura 5.45: Disposição dos microtúbulos na célula Vero contendo VP de *T. gondii*. Distribuição dos microtúbulos, revelados pela tubulina (em verde), nas células após 72 h de infecção que apresentaram VP (setas) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Sobreposição de A e B (C). Barra: 10 μ m

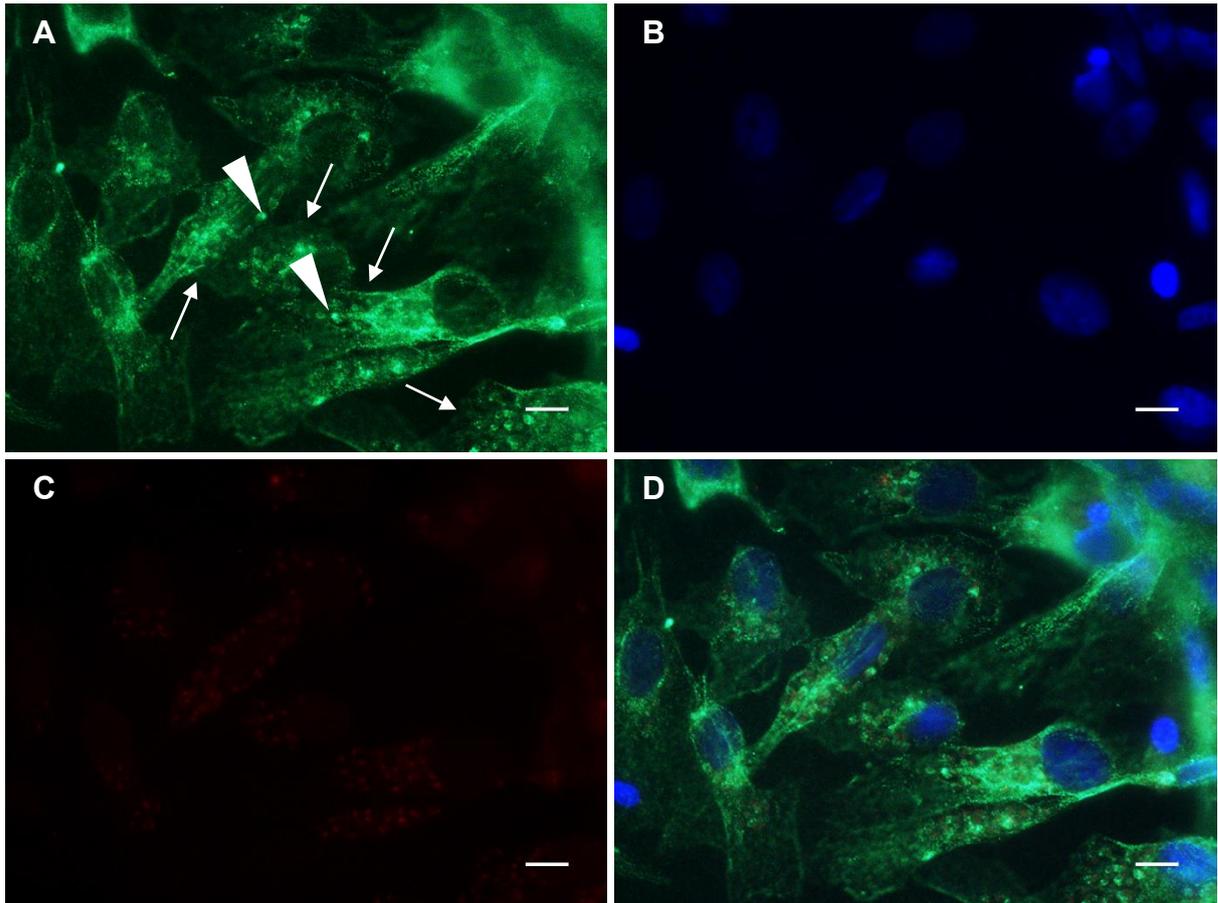


Figura 5.46: Disposição dos microtúbulos nas células Vero contendo VP em transição de *T. gondii*. Distribuição dos microtúbulos (em verde) sem alteração na presença de VP em transição após 120 h de infecção (setas). Nota-se a marcação dos microtúbulos do parasito (cabeças de seta) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição apresentando marcação com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μm

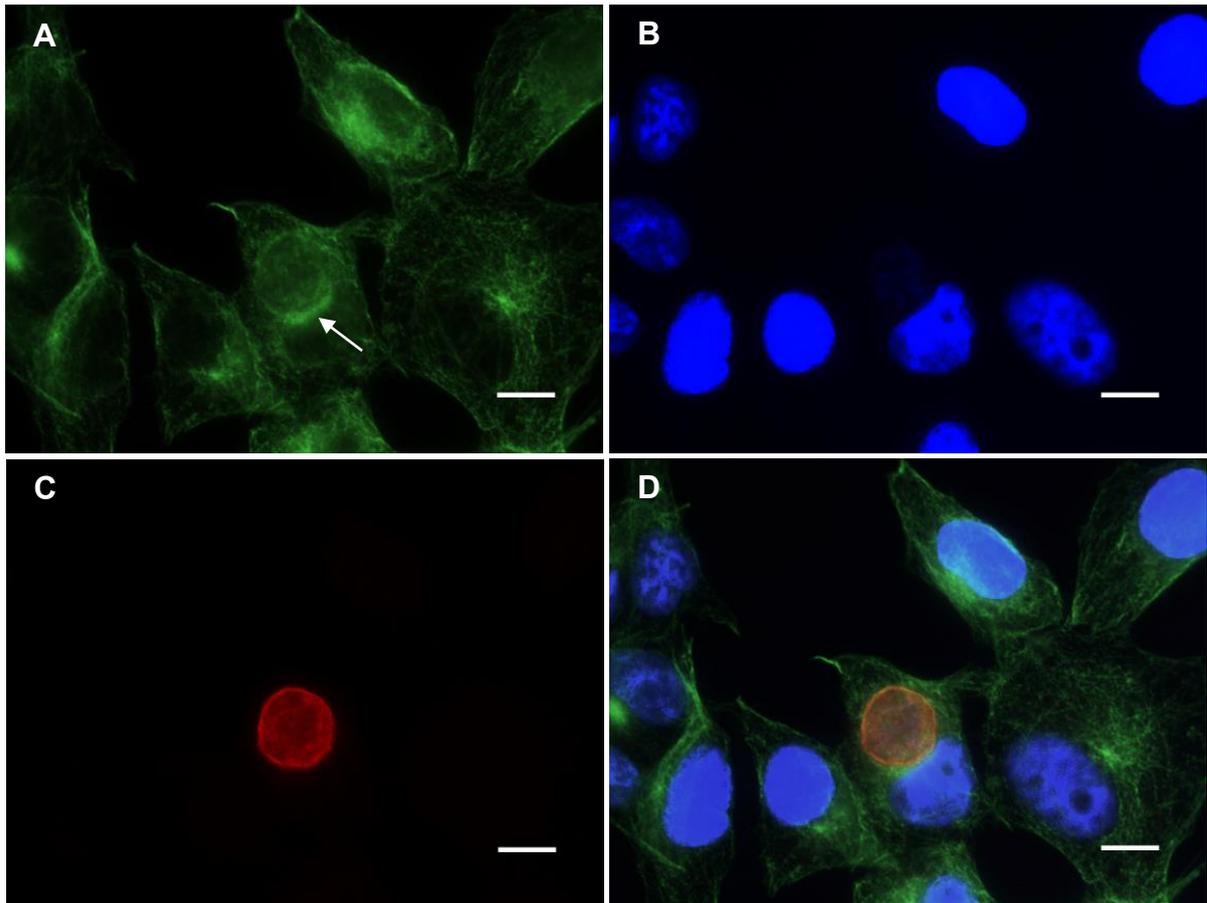


Figura 5.47: Reorganização dos microtúbulos das células Vero ao redor do cisto de *T. gondii*. β -tubulina (em verde) circundando o cisto (seta) presente no interior da célula após 72 h de infecção (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto marcado com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

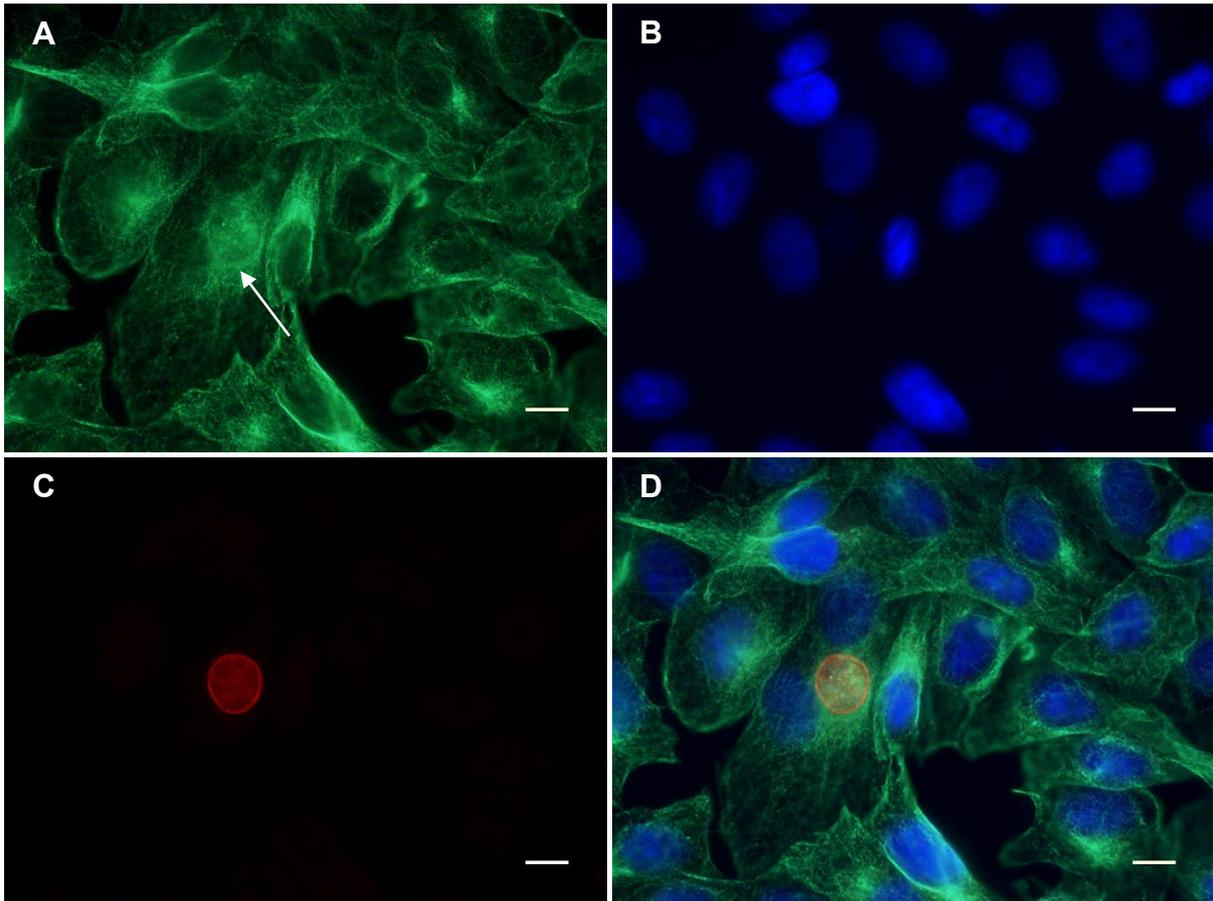


Figura 5.48: Remodelamento dos microtúbulos da células Vero na periferia de um cisto de *T. gondii*. Reestruturação (seta) dos microtúbulos (em verde) da célula após 120 h de infecção (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto revelado pela DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

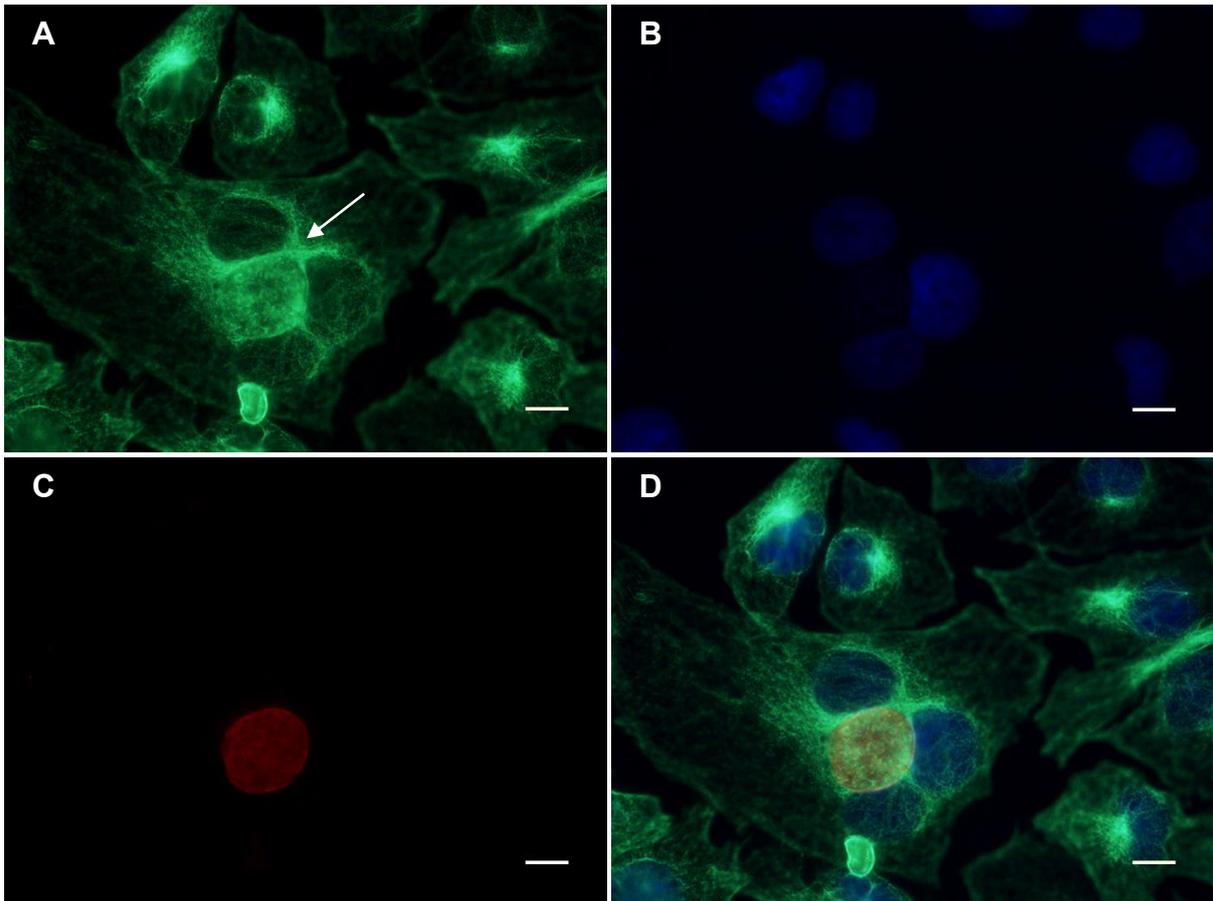


Figura 5.49: Distribuição dos microtúbulos em célula Vero alterada na presença de cisto de *T. gondii*. Reorganização (seta) dos microtúbulos (em verde) da célula após 72 h de infecção, imediatamente ao redor do cisto. A tubulina do parasito também foi evidenciada (cabeça de seta) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto revelado pela DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

Os filamentos intermediários da célula epitelial abordados neste trabalho foram aqueles formados pelas proteínas citoqueratinas. A distribuição destes filamentos nas células não infectadas foi observada em forma de rede, estendendo-se do núcleo para a membrana celular e distribuindo-se por todo o citoplasma (Figura 5.50). Em células infectadas foram encontrados diferentes perfis de distribuição dos filamentos de citoqueratina. As regiões da célula Vero, onde se localiza o VP de *T. gondii*, não demonstraram alteração no arranjo da citoqueratina (Figura 5.51). Porém, quando este VP se encontrava em transição para cisto tecidual (VP em transição), apresentando reação para a lectina DBA, o remodelamento dos filamentos de citoqueratina no entorno da estrutura deste vacúolo pôde ser evidenciado (Figuras 5.51, 5.52, 5.53 e 5.54). O mesmo padrão de organização destes filamentos encontrados ao redor dos VP em transição foi observado nas células infectadas onde a cistogênese foi estabelecida (Figuras 5.54 e 5.55). Contudo, a marcação da citoqueratina na região que circunda os cistos é mais intensa do que aquela observada em VP em transição. A diferença na intensidade da marcação dos filamentos está possivelmente relacionada ao estágio de maturação das estruturas: quanto mais o VP em transição se aproxima do seu estabelecimento com o cisto, mais intensa a marcação para a citoqueratina é detectada, sendo o máximo de intensidade observada ao redor dos cistos maduros.

Todas as alterações da disposição das proteínas avaliadas neste trabalho não foram diretamente dependentes do tempo de infecção, mas da presença do parasito.

O quadro 5.1 mostra a compilação dos dados, com os resultados da análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas na CME e célula epitelial renal durante a cistogênese de *T. gondii*.

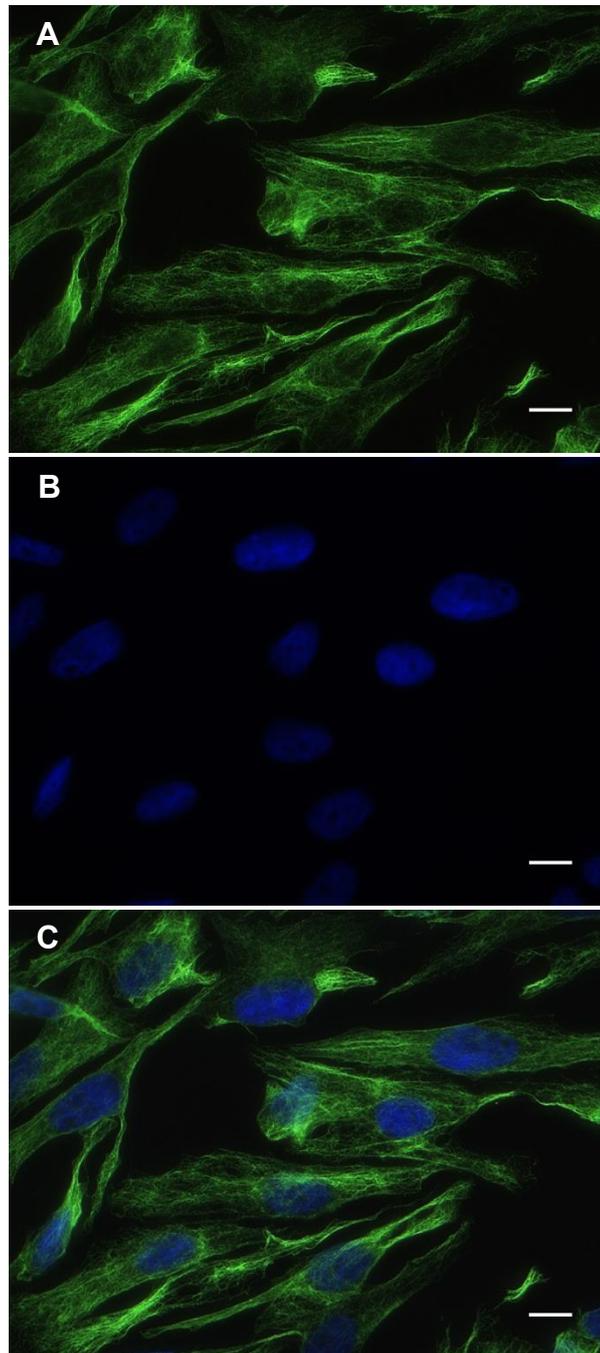


Figura 5.50: Perfil de distribuição dos filamentos de citoqueratina na célula epitelial renal Vero não-infectada. Filamentos de citoqueratina (em verde) distribuídos do núcleo para a periferia celular, ocupando todo citoplasma (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Sobreposição de A e B (C). Barra: 10 μ m

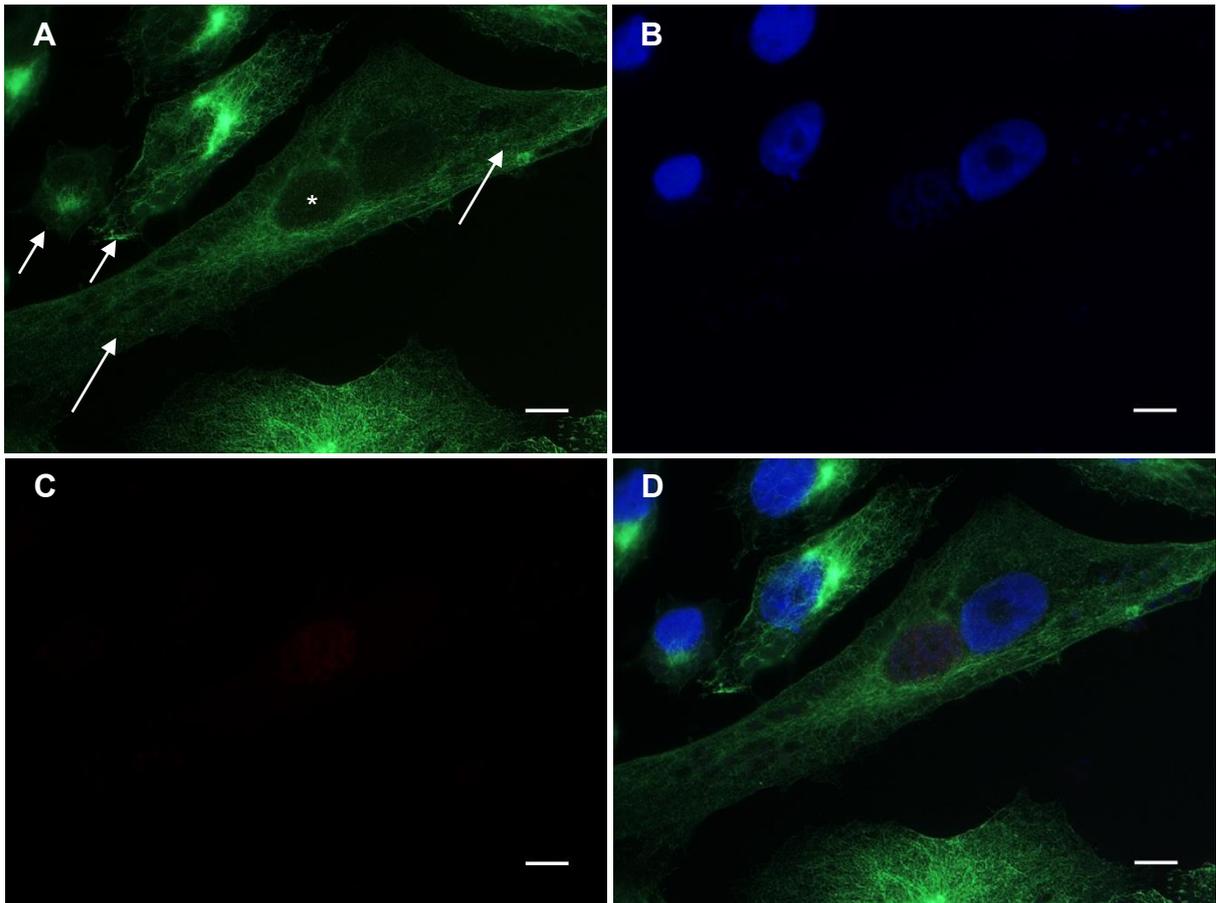


Figura 5.51: Organização dos filamentos de citoqueratina na célula epitelial renal Vero após 72 h de infecção com *T. gondii*. Regiões da célula que apresentam VP (setas) não demonstram remodelamento dos filamentos de citoqueratina (em verde). A reorganização destes filamentos foi observada ao redor do VP em transição (*) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição apresentando reação com a lectina DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

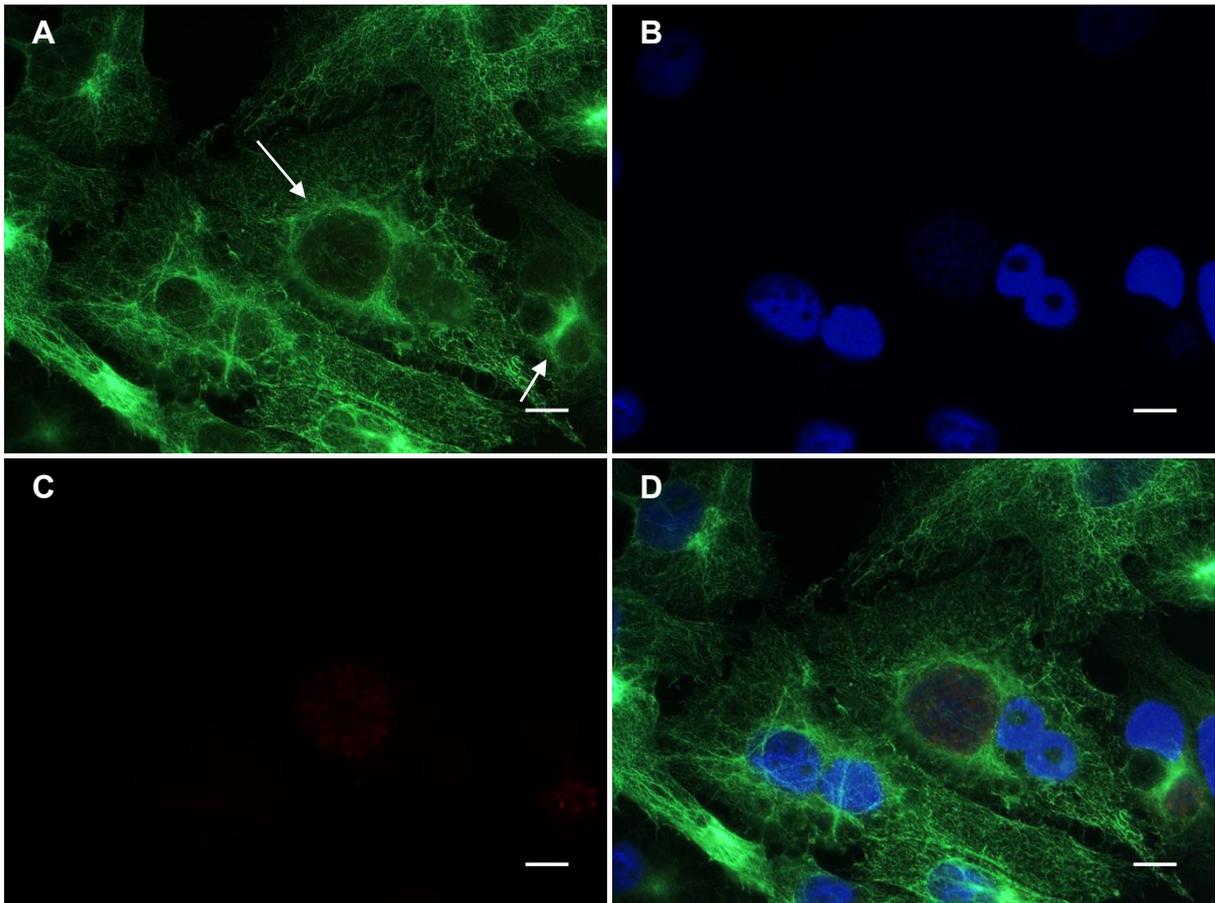


Figura 5.52: Alteração do perfil dos filamentos de citoqueratina dispostos ao redor de VP de *T. gondii* em transição em células Vero. Remanejamento da citoqueratina (em verde) da célula após 72 h de infecção para o entorno dos VP em transição (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição apresentando marcação com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

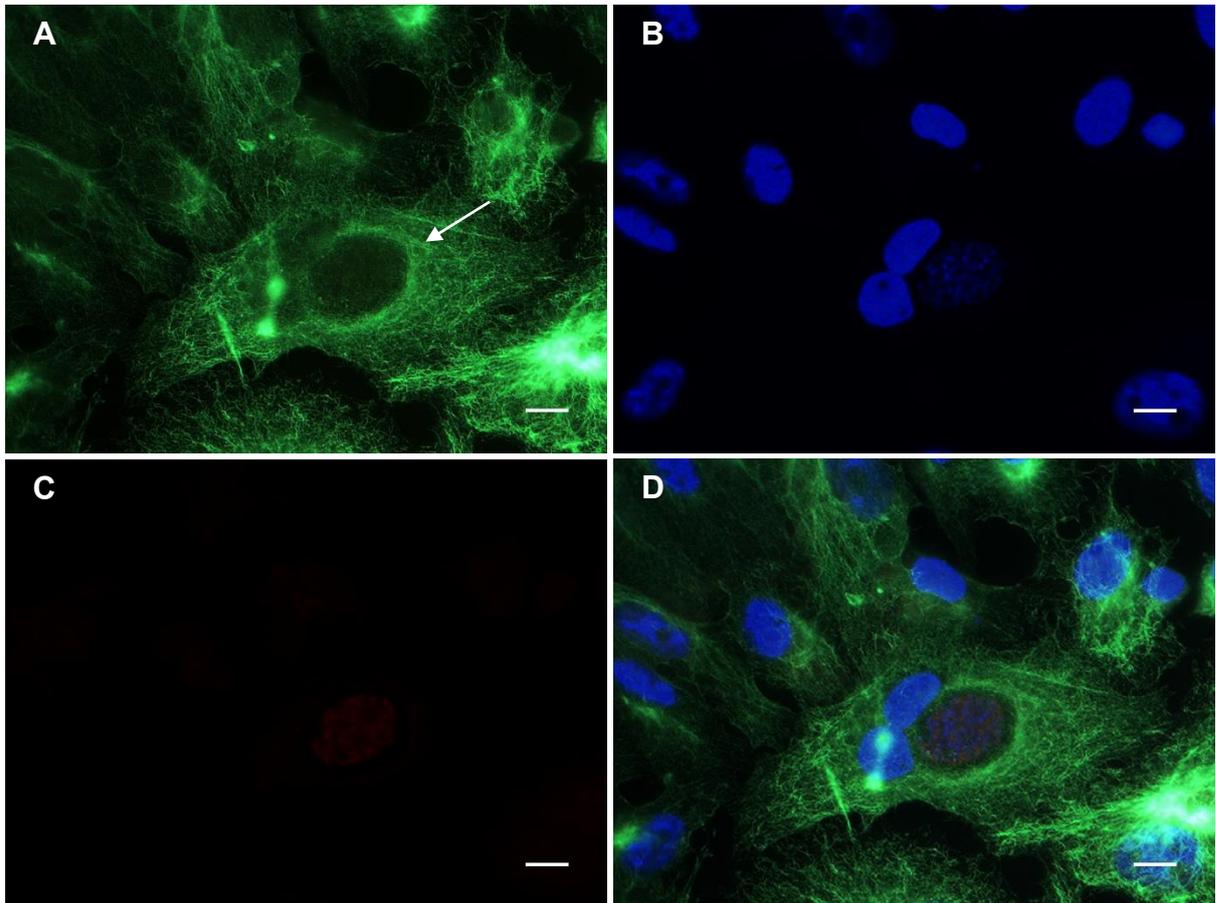


Figura 5.53: Remodelamento dos filamentos de citoqueratina na célula Vero na presença do VP de *T. gondii* em transição. Rearranjo dos filamentos de citoqueratina (em verde) da célula após 120 h de infecção, os quais circundam o VP em transição (seta) (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição reagindo com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

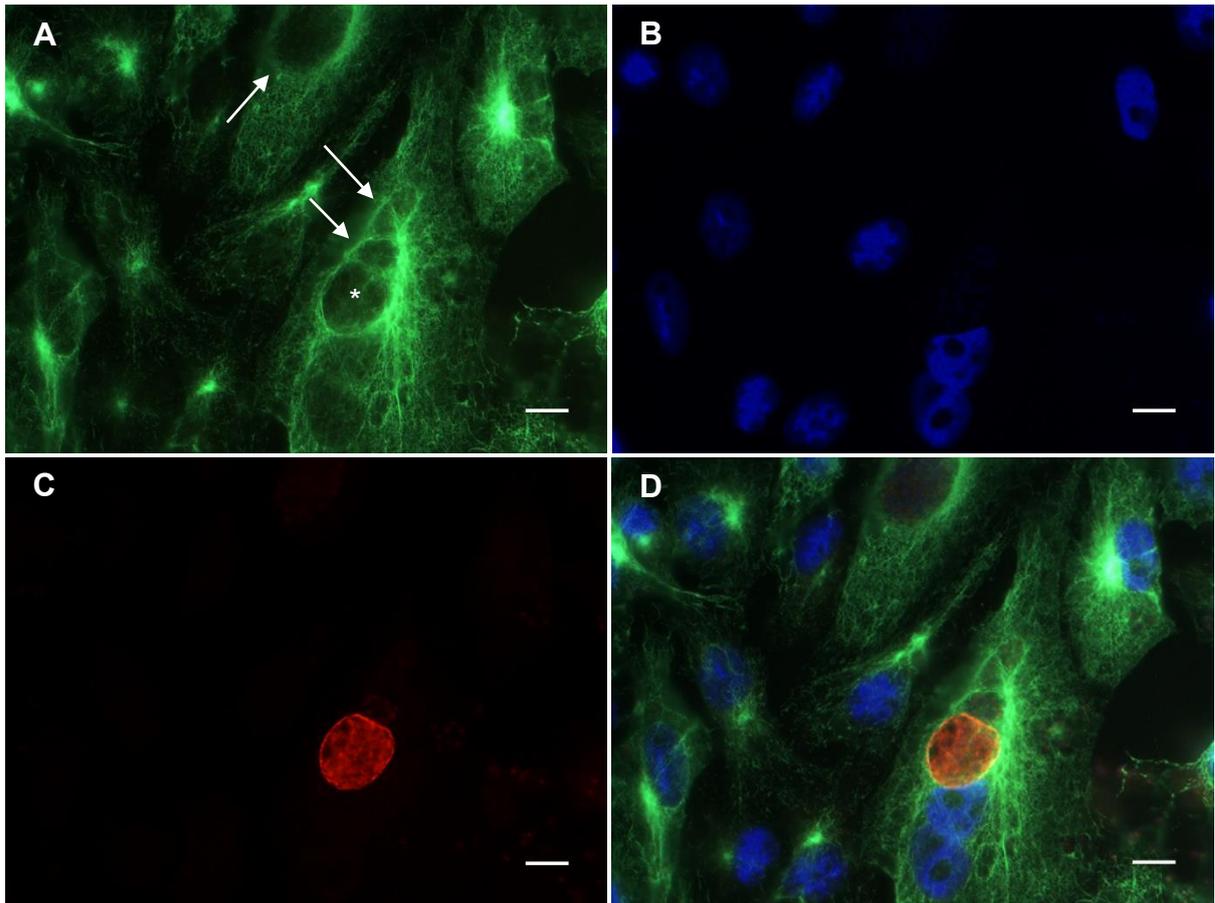


Figura 5.54: Rearranjo dos filamentos de citoqueratina da célula Vero ao redor de um cisto e de um VP de *T. gondii* em transição. Distribuição da citoqueratina (em verde) ao redor dos VP em transição (setas), semelhante àquela observada quando há um cisto (*) em uma célula Vero após 120 h de infecção(A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). VP em transição e cisto marcados com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

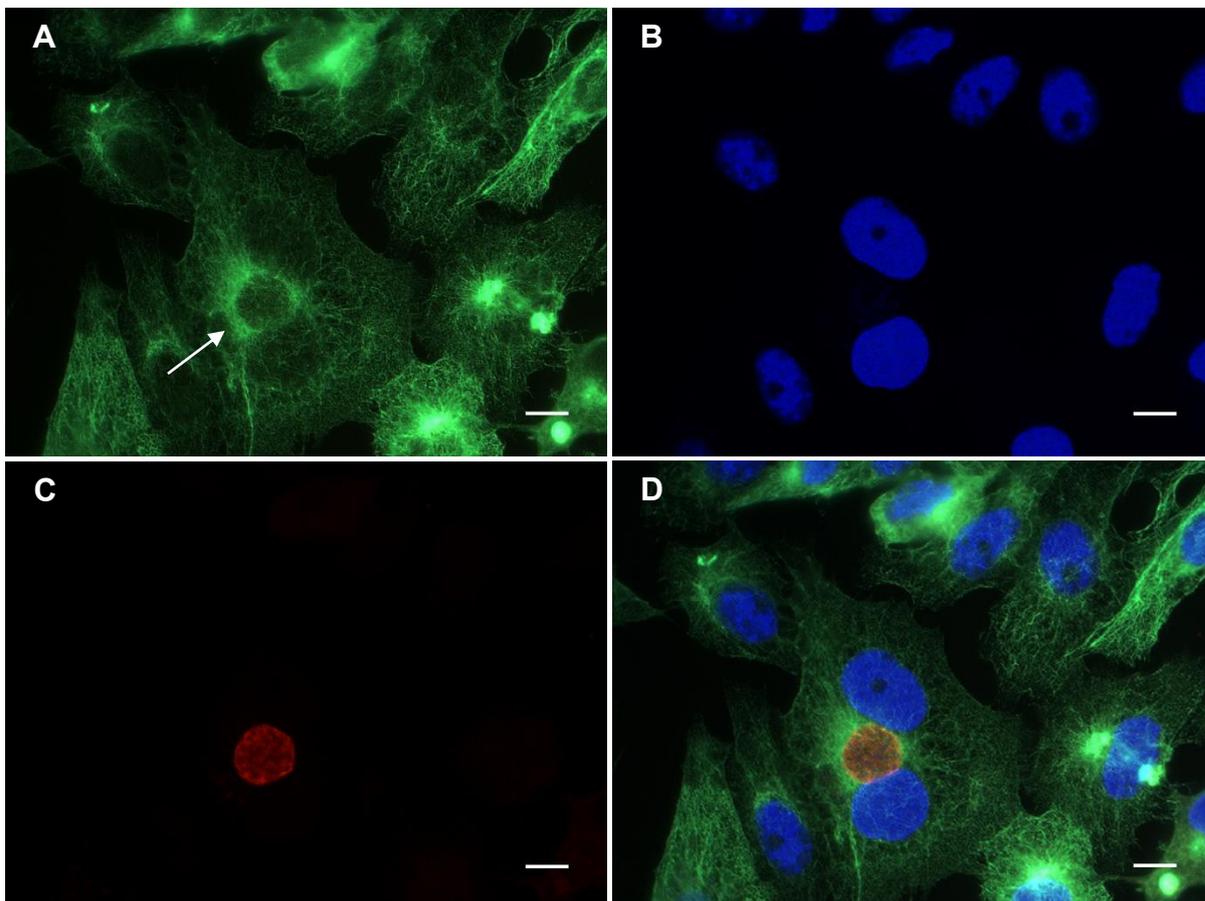


Figura 5.55: Remodelamento da citoqueratina ao redor de um cisto de *T. gondii* na célula Vero. Filamentos de citoqueratina (em verde) circundando o cisto (seta), alterando o padrão de distribuição destes filamentos observado na célula não-infectada em uma cultura após 72 h de infecção (A). Núcleos visualizados pela marcação com DAPI (em azul) (B). Cisto marcado com DBA (em vermelho) (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra: 10 μ m

Quadro 5.1: Compilação dos resultados obtidos a partir da análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas na CME e célula epitelial renal durante a cistogênese de *T. gondii*.

| Proteína | CME (linhagem C2C12) | Célula epitelial renal (linhagem Vero) |
|--|---|--|
| F-actina | AI | VP transição (-) Cistos (-) |
| β-tubulina | Cisto em CME mononucleada (+) Cisto em miotubo/miofibra (-) | VP (-) VP em transição (-) Cisto (+) |
| Filamento intermediário | Desmina Cisto em miotubo (+) Cisto em miofibra (-) | Citoqueratina VP (-) VP em transição (+) Cisto (+++) |
| Miosina (cadeias pesada e leve) | VP (-) Cisto (-) | — |
| Plectina (todas as isoformas) | VP (+) VP em transição (+) Cisto (+) | — |

Vacúolo parasitóforo (VP); Vacúolo parasitóforo contendo parasitos em transição taquizoíto-bradizoíto (VP em transição); célula muscular esquelética (CME); Presença de remodelamento (+); Sem alteração no perfil de distribuição (-); Análise inconclusiva (AI); Marcação intensa (+++)

EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES

Atendendo ao objetivo 2.3 “Avaliar a interação e produção de formas infectantes de *T. gondii* da cepa avirulenta ME-49 em células Vero, *in vitro*” serão apresentados a seguir um conjunto de dados preliminares na forma de experimentos complementares.

6.1 Materiais e métodos

6.1.1. Linhagem celular epitelial renal Vero (como descrito no item 4.2.2)

6.1.2. Obtenção de bradizoítos a partir de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* (como descrito no item 4.3.1)

6.1.3. Obtenção de taquizoítos a partir de culturas de células Vero infectadas com bradizoítos de *T. gondii*

Culturas contendo 2×10^6 células Vero foram infectadas na relação 10:1 com bradizoítos obtidos a partir de cistos isolados do cérebro de camundongos cronicamente infectados. Após 120 h de interação parasito-célula hospedeira, os taquizoítos liberados no sobrenadante foram coletados por centrifugação diferencial (180 g por 7 min, seguida 1.500 g por 10 min), quantificados e utilizados nos ensaios experimentais e/ou na manutenção da cepa a partir da infecção de novas culturas utilizando a relação parasito-célula de 3:1.

6.1.4. Quantificação da produção de cistos de *T. gondii* em células Vero

Duplicatas de culturas contendo 2×10^6 células Vero foram semeadas em garrafas de 25 cm² e após 24 h de plaqueamento, infectadas com taquizoítos da cepa ME-49 na relação 3:1 e 5:1. Estas culturas foram monitoradas diariamente e o meio trocado a cada dois dias. Ao final de 120, 168 e 240 h pós-infecção, estas células foram coletadas. Para o isolamento de cistos, as células foram destacadas do plástico com o auxílio de um raspador de células. Estas células foram homogeneizadas 4-5 vezes com uma agulha de 0.45 mm x 13 mm, ressuspensas em PBS a 4°C e centrifugadas a 1.569 g por 10 min. Ao sedimento gerado foi adicionado 25% de dextran, homogeneizado e submetido à centrifugação de 2.200 g durante 10 min. O sedimento contendo os cistos foi lavado 3 vezes em PBS a 4°C. Um volume de 20 µl da suspensão total foi colocado entre lâmina e lamínula (24 x 32 mm) e o número de cistos determinado por contagem total da lamínula. As amostras foram analisadas com auxílio do microscópio Primo Vert da Zeiss utilizando objetiva de 20 X e as imagens capturadas com a câmara AxioCam ICc5.

6.1.5. Caracterização dos estágios evolutivos de *T. gondii* encontrados em células Vero

A identificação dos estágios evolutivos foi realizada por meio de sondas em culturas infectadas com taquizoítos, na relação parasito-célula 3:1 e após 120 h de interação. Para identificação de taquizoítos por imunomarcção foi utilizado o anticorpo anti-p30 (Santa Cruz), que reconhece especificamente a proteína SAG1 encontrada na membrana plasmática deste estágio evolutivo. Para identificação dos cistos teciduais foi utilizada a lectina DBA conjugada à rodamina. As células foram fixadas em 4% PFA diluído em PBS por 5 min a temperatura ambiente e lavadas em PBS. Após a fixação, as células foram incubadas em 50 mM cloreto de amônia por 30 min para bloqueio dos radicais aldeídos livres, permeabilizadas em PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% BSA (Sigma-Aldrich) por 60 min. Para o ensaio de imunofluorescência indireta, as culturas foram incubadas por 2 h a 37°C

com o anticorpo anti-p30 (1:100) diluído em PBS/BSA 4%. A seguir, as células foram lavadas com PBS/BSA 4% e incubadas durante 1 h a 37°C com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com Alexa 488 (Life Technologies) na diluição 1:1.000 em PBS/BSA 4%. Para a realização da identificação de cistos foi usada a fluorescência direta. As culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com diluição de 1:100 da lectina DBA-rodamina (Vector) em PBS/BSA 4%. Após lavagem em PBS, as culturas foram montadas ProLong® Gold contendo DAPI (Molecular Probes). Os controles das reações foram realizados na ausência do anticorpo primário e por ensaio de competição da lectina DBA com 50 mM de N-acetil-galactosamina. As amostras foram analisadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.A2 da Zeiss utilizando objetiva de 100 X e as imagens capturadas com a câmara AxioCam MRc.

6.1.6. Análise ultraestrutural dos taquizoítos e cistos de *T. gondii* produzidos em célula Vero

Para as análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células Vero foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e após 24 h de plaqueamento, infectadas com taquizoítos da cepa ME-49 na proporção de 5:1 e 10:1. As culturas foram lavadas em PBS e fixadas após 168-216 h de infecção, em 2,5% glutaraldeído diluído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl₂ por 1 h a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl₂ por 30 min a 4°C, protegidas da luz. Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão e com auxílio de raspador de células foram destacadas do plástico e desidratadas em série crescente de acetona até 100%. O material foi então impregnado lentamente com resina epóxi (Poly/Bed® 812 – Polysciences) dissolvido em acetona, nas seguintes proporções de acetona-epoxi: 3:1, 2:1, 1:1 e 1:3 “overnight”. A seguir, o material foi colocado em resina pura por 4 h e polimerizado a 60°C por 48 h. Cortes ultrafinos foram recolhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo para análise ao microscópio eletrônico de

transmissão Jeol JEM-1011 da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz.

6.2 Resultados

6.2.1 Produção de cistos de *T. gondii* da cepa ME-49 em células Vero

A partir da obtenção de taquizoítos da cepa ME-49 foram realizadas infecções de culturas de células Vero nas relações parasito-célula hospedeira 3:1 e 5:1. A quantificação da produção de cistos foi realizada 120, 168 e 240 h pós-infecção. Nenhuma manobra experimental de indução da cistogênese foi empregada nestes ensaios.

A produção de cistos em célula Vero foi dependente da relação parasito-célula e do tempo de duração da infecção das culturas (Figura 6.1). A maior eficiência foi evidenciada com a menor carga parasitária (3:1) e no menor tempo de análise (120 h). As culturas infectadas com a relação 3:1 apresentaram 16.950 ± 2.450 cistos após 120 h de infecção, enquanto aquelas infectadas com a maior relação (5:1) geraram 9.250 ± 3.350 cistos. Com o avanço do tempo de infecção, o número de cistos decaiu para $8.100 \pm 1.900/6.500 \pm 2.300$ e $850 \pm 50/200 \pm 100$ em 168 e 240 h, nas relações 3:1 e 5:1, respectivamente (Figura 6.1). A análise morfológica dessas culturas vivas observadas por microscopia de contraste de fase mostra células com vários vacúolos parasitóforos (VP) repletos de parasitos, ao lado de células contendo estruturas muito semelhantes a cistos, ao longo do curso da infecção (Figura 6.2).

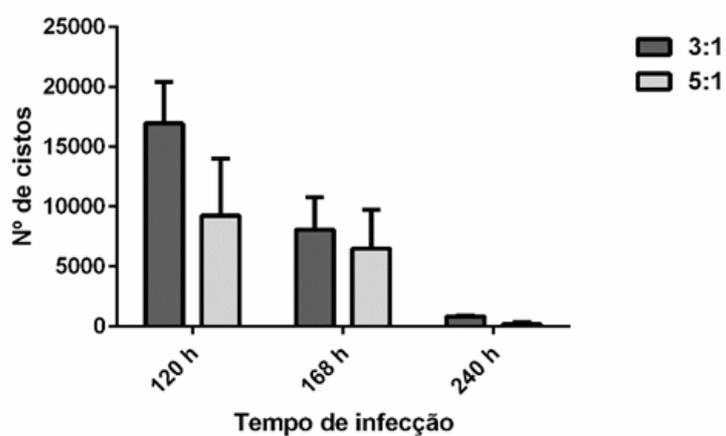


Figura 6.1: Produção de cistos de *T. gondii* da cepa ME-49 em células Vero. Análise quantitativa das culturas infectadas com duas relações parasito-célula hospedeira, 3:1 e 5:1. A formação de cistos foi maior quanto a relação parasito-célula utilizada foi menor.

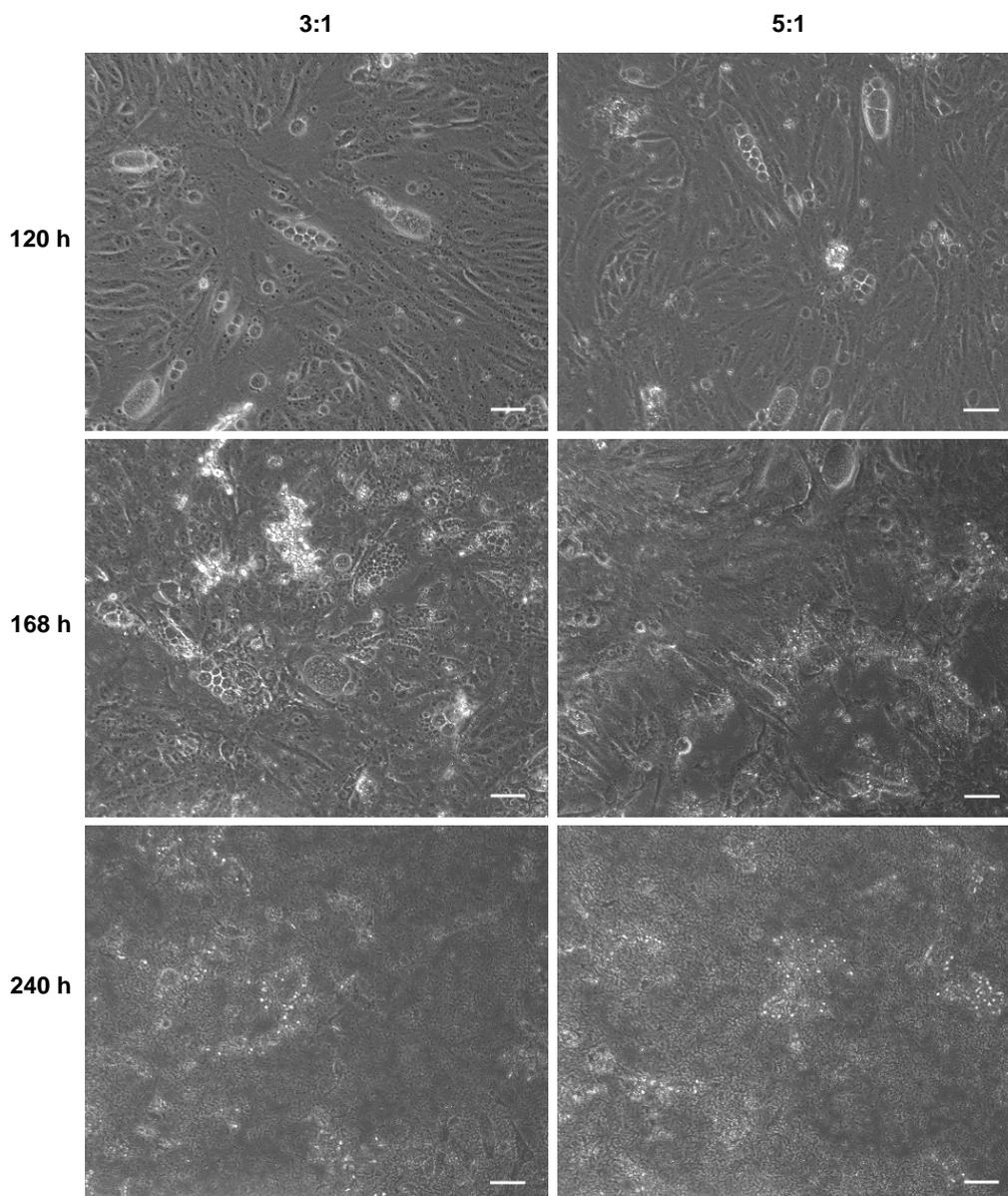


Figura 6.2: Morfologia das culturas de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. A análise das culturas vivas por microscopia óptica de contraste de fase confirma os dados obtidos nos ensaios quantitativos. O número de cistos (cabeças de seta) presente nas relações 3:1 e 5:1 diminui ao longo do experimento, evidenciado pela presença de parasitos livres (taquizoítos) nas culturas com 240 h de infecção. Barra: 20 μ m

6.2.2 Análise por microscopia de fluorescência das formas evolutivas de *T. gondii* produzidas em células Vero

A fim de identificar as formas evolutivas produzidas em culturas de células Vero, infectadas a partir de taquizoítos, foi realizada a técnica de imunofluorescência por meio de marcadores de taquizoítos (anti-p30) e de cistos (citoquímica com a lectina DBA-rodamina). Culturas infectadas na relação parasito-célula hospedeira 3:1 foram analisadas após 120 h de interação. Tanto taquizoítos quanto cistos foram identificados nestas culturas (Figura 6.3). VP apresentando marcação tanto para taquizoíto quanto para o açúcar que compõe a parede cística foram nomeados VP em transição (Figura 6.3 A).

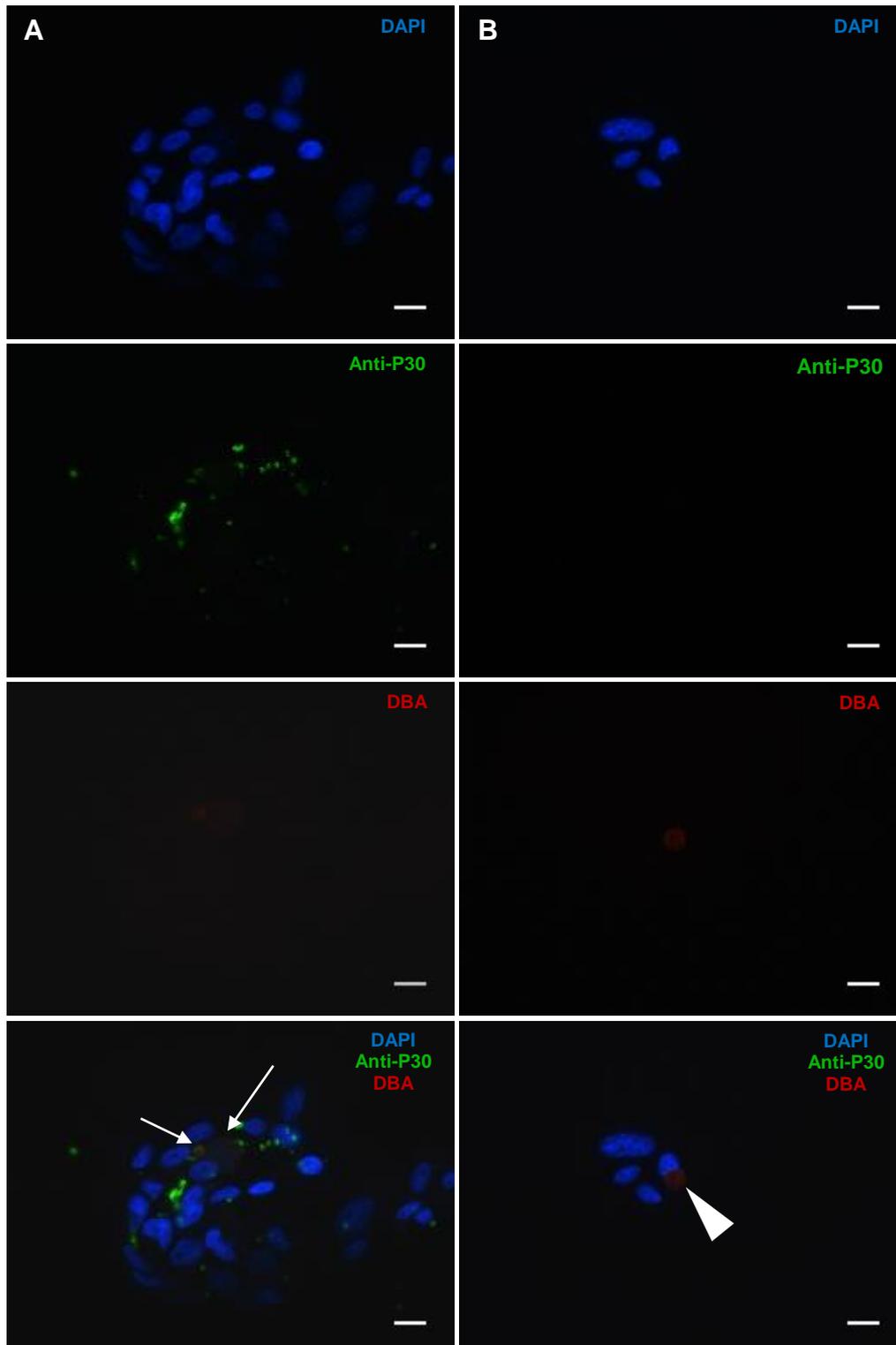


Figura 6.3: Análise estrutural das formas de *T. gondii* da cepa ME-49 produzidas em células Vero. Tanto tachizoítos quanto cistos foram identificados em culturas infectadas com tachizoítos na relação 3:1 após 120 h de interação (A). No conjunto de imagens foram visualizados VP contendo tachizoítos (em verde) e VP em transição (setas), onde há dupla marcação para tachizoítos e parede cística (em vermelho). Cistos maduros também estavam presentes nestas culturas (cabeça de seta) (B). Barra: 20 μ m

6.2.3 Análise ultraestrutural das células Vero

A morfologia ultraestrutural das células da linhagem Vero normal, não-infectada, confirmou sua natureza epitelial por apresentarem características como: adesão ao substrato com alinhamento lateral, contatos célula-célula, polarização e presença de microvilosidades (Figura 6.4 A e B). Além disso, como essas células foram coletadas da zona cortical renal, mostram uma grande quantidade de mitocôndrias alongadas, com cristas transversais e com distribuição longitudinal, preferencialmente ao eixo principal celular. Perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e liso (REL) foram localizados por todo o citoplasma, enquanto as cisternas do Golgi estiveram presentes nas proximidades do núcleo (Figura 6.4 A e B).

6.2.4. Análise ultraestrutural da interação de células Vero durante a infecção primária com formas taquizoítas de *T. gondii* da cepa ME-49

A análise de cortes ultrafinos por MET de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, por períodos que variaram de 168 a 216 h de interação, justifica-se, pois, nossa proposta foi analisar o fenômeno do processo de encistamento do parasito nestas células. Desta forma, serão descritos diferentes aspectos da resposta celular à presença do *T. gondii* e traçados alguns parâmetros que auxiliarão no entendimento, não temporalmente, mas sim da dinâmica desse evento com base na identificação dos estágios infectivos nas diferentes etapas do ciclo celular e ainda, as alterações morfológicas do VP decorrentes do processo do estabelecimento da cistogênese. Dada a falta de sincronismo no processo de invasão de *T. gondii* e o longo período de interação parasito-célula hospedeira analisado, diferentes estágios dessa interação puderam ser relatados e serão apresentados a seguir.

(i) Presença de células recém-infectadas (produto do egresso de taquizoítos que concluíram o ciclo lítico) com a presença de um único parasito intracelular, localizado num compartimento envolto por membrana no citoplasma da célula hospedeira, o VP (Figura 6.5 A-B). A morfologia deste VP apresentou a matriz

vacuolar contendo a rede túbulo-vesicular (RTV) ainda pouco desenvolvida (Figura 6.5 A-B). É nítida a migração de mitocôndrias para o entorno do VP e sua associação com a membrana do VP (MVP), além de vários perfis de RER em estreito contato com a MVP, mediando ou não a associação da mitocôndria com a MVP (Figura 6.5 A). Como observado na figura 6.5 B, não foi incomum encontrar células com um único perfil de RER envolvendo todo o vacúolo.

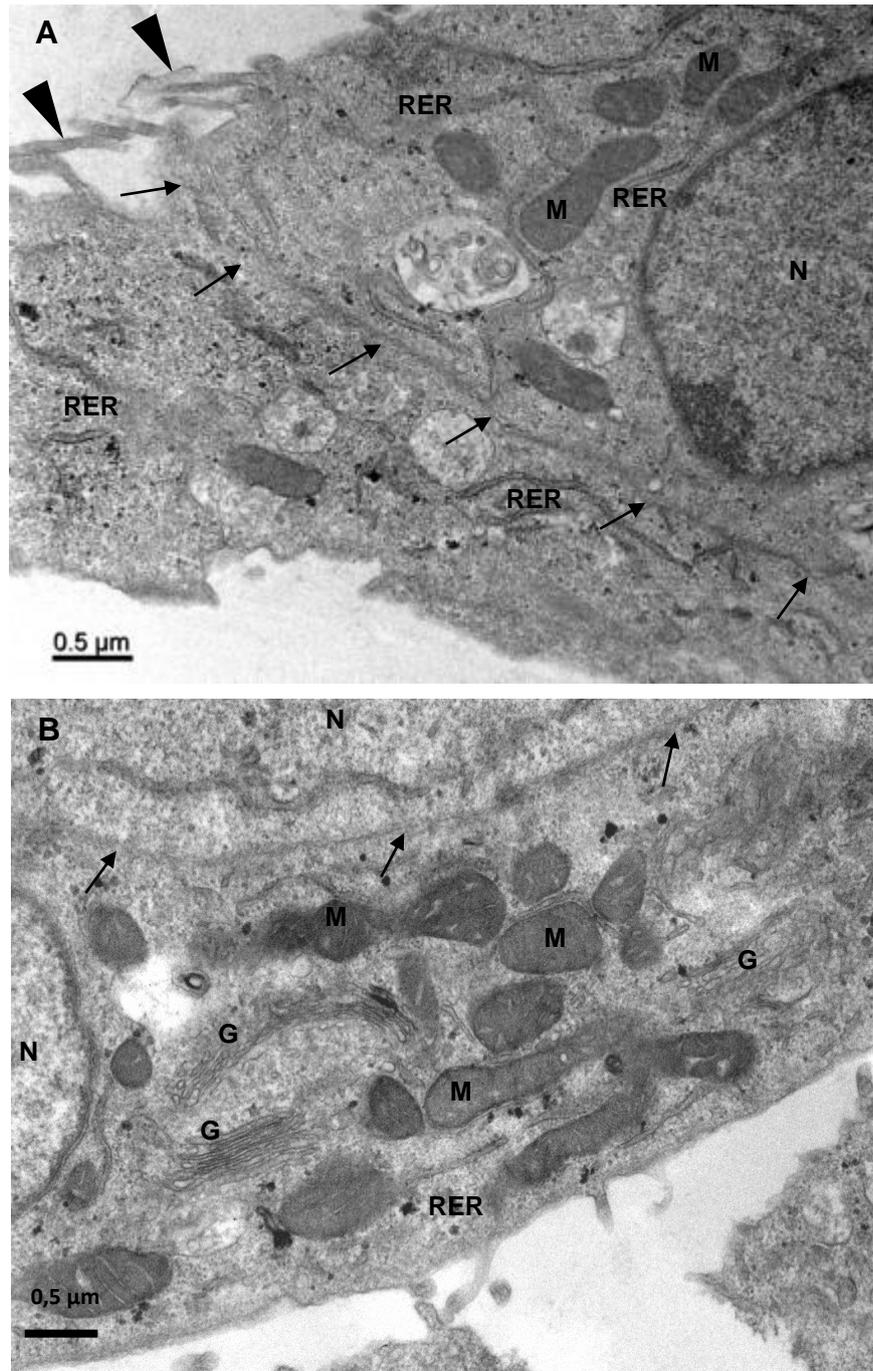


Figura 6.4: Ultraestrutura da célula Vero não-infectada. Alinhamento e justaposição celular característico de células epiteliais (A e B), polarização (A), regiões de contato célula-célula (setas) e microvilosidades (cabeças de setas). Presença de grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias (M). Núcleo (N); Golgi (G)

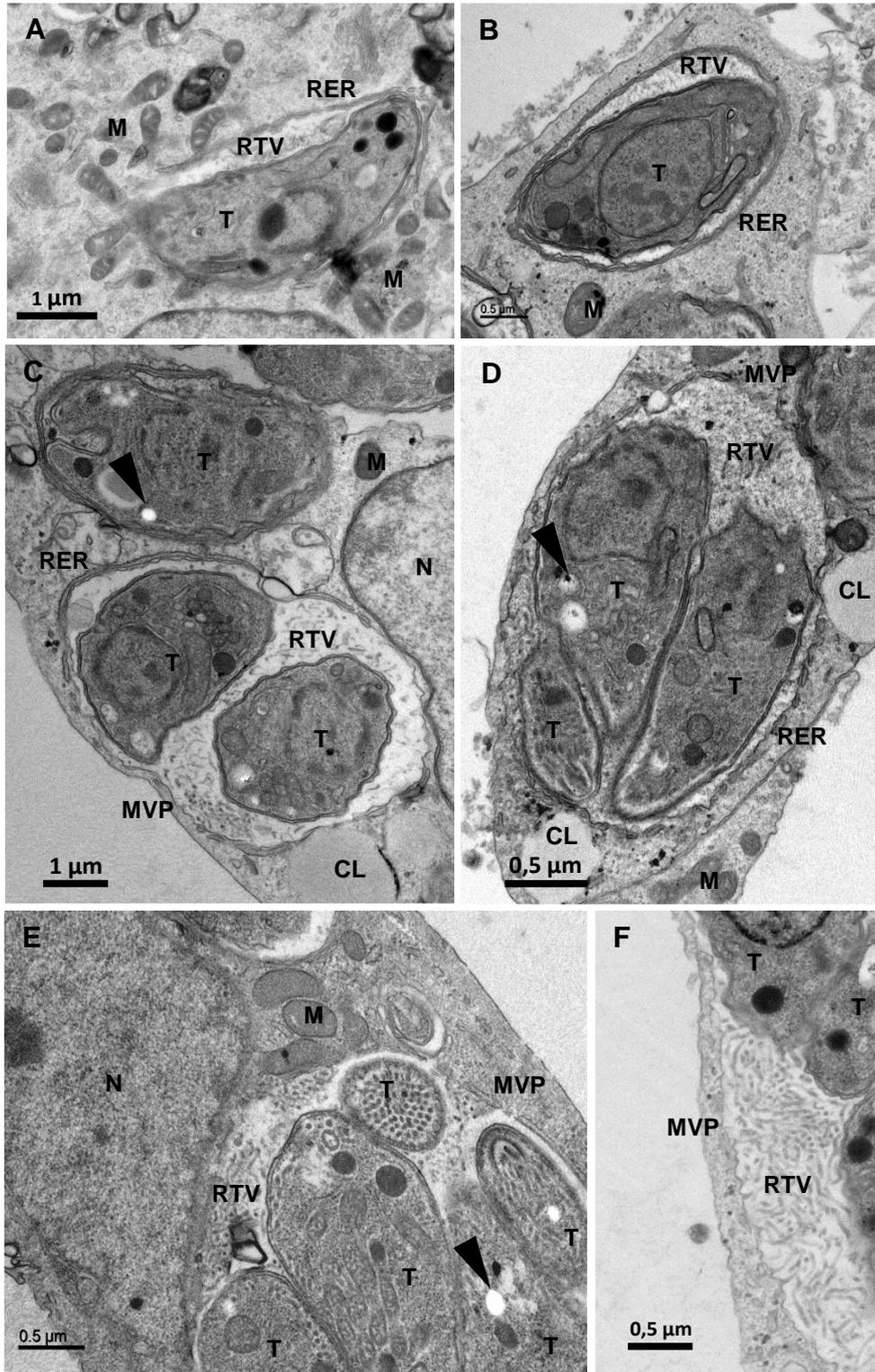


Figura 6.5: Ultraestrutura de células Vero recém-infectadas com taquizoítos de *T. gondii*. Observa-se a migração de mitocôndrias e RER para a periferia do VP (A e B). Os parasitos estão envolvidos pela rede túbulo-vesicular (RTV) no interior do VP e ocorre associação de organelas à membrana do VP (MVP) (C-F). Mitocôndrias (M); Núcleo da célula hospedeira (N); Taquizoítos (T); Corpúsculos lipídicos (CL); Grânulos de amilopectina (cabeça de seta)

(ii) Presença de células com VP contendo parasitos em duplas, indicativo de processo de divisão celular, e/ou apresentando vários parasitos por VP (Figura 6.5 C e D) que correspondeu também ao aumento do desenvolvimento da RTV (Figura 6.5 E e F), manutenção da associação com RER e mitocôndrias (Figura 6.5 C-E) e ainda, corpúsculos lipídicos em contato direto com a MVP (Figura 6.5 D). Muito embora esses VP mantenham ainda as características da presença de taquizoítos, em alguns deles os parasitos intravacuolares apresentam grânulos de amilopectina, o que é indicativo de que a conversão taquizoíto-bradizoítos está se estabelecendo (Figura 6.5 C-E).

(iii) Presença de várias células contendo bradizoítos, que à semelhança dos taquizoítos, recrutam organelas da célula hospedeira durante a sua estada no interior do VP (Figura 6.6 A-F). Esta dinâmica de recrutamento de mitocôndrias e RER está bem representada na figura 6.6 A-D. Nota-se que as mitocôndrias podem ser encontradas associadas ao VP mediadas pelo RER já aderido à MVP ou interagindo diretamente com a MVP, como pode ser observado em destaque na figura 6.6 D e E. Alguns cortes sugerem a participação somente de RER à MVP contendo bradizoítos (Figura 6.6 F). A figura 6.7 A e C mostram um aspecto geral de células multi-infectadas tendo em vista a presença de vários VP contendo um único parasito, sendo a maioria com bradizoítos. Essas imagens apontam que as células não são refratárias à novas infecções e que a estágio-conversão de taquizoítos para bradizoítos pode ser estabelecida, antes mesmo do processo de divisão celular de taquizoítos. Nota-se também que ocorre uma rarefação da RTV à medida que se estabelece essa conversão e a matriz vacuolar passa a apresentar um aspecto granular (Figura 6.7 A-C). Um outro aspecto observado é o maior acúmulo de mitocôndrias durante o processo de divisão celular (Figura 6.7 A e C). Há de se registrar a alta incidência de ondulação da MVP entre vacúolos (Figura 6.7 C). A figura 6.8 mostra diferentes estágios da formação de cistos evidenciados pelo maior acúmulo de grânulos de amilopectina nos bradizoítos e aumento da eletrondensidade da MVP que irá constituir a parede cística.

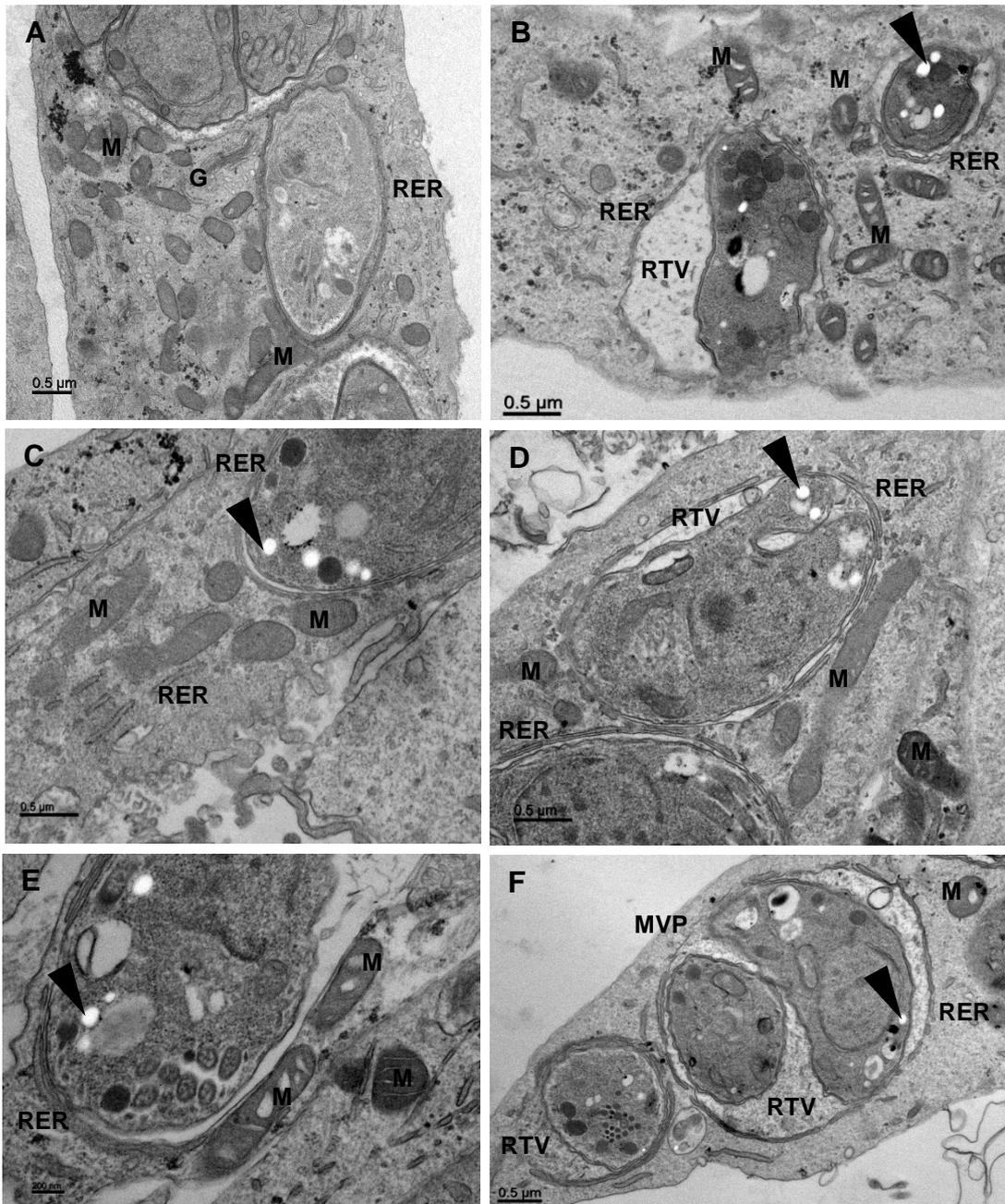


Figura 6.6: Ultraestrutura de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii* contendo parasitos em estágio-conversão. Evidencia-se a diferenciação de taquizoíto para bradizoíto pela presença grânulos de amilopectina (cabeças de seta) no interior dos parasitos. Migração de mitocôndrias (M) e RER em torno desses VP (A-F). A rarefação da rede túbulo-vesicular (RTV) inicia-se com a formação da matriz cística, adquirindo aspecto granular (A-B, D e F). Detalhes da associação de organelas e MVP (D e E). Golgi (G); Núcleo da célula hospedeira (N)

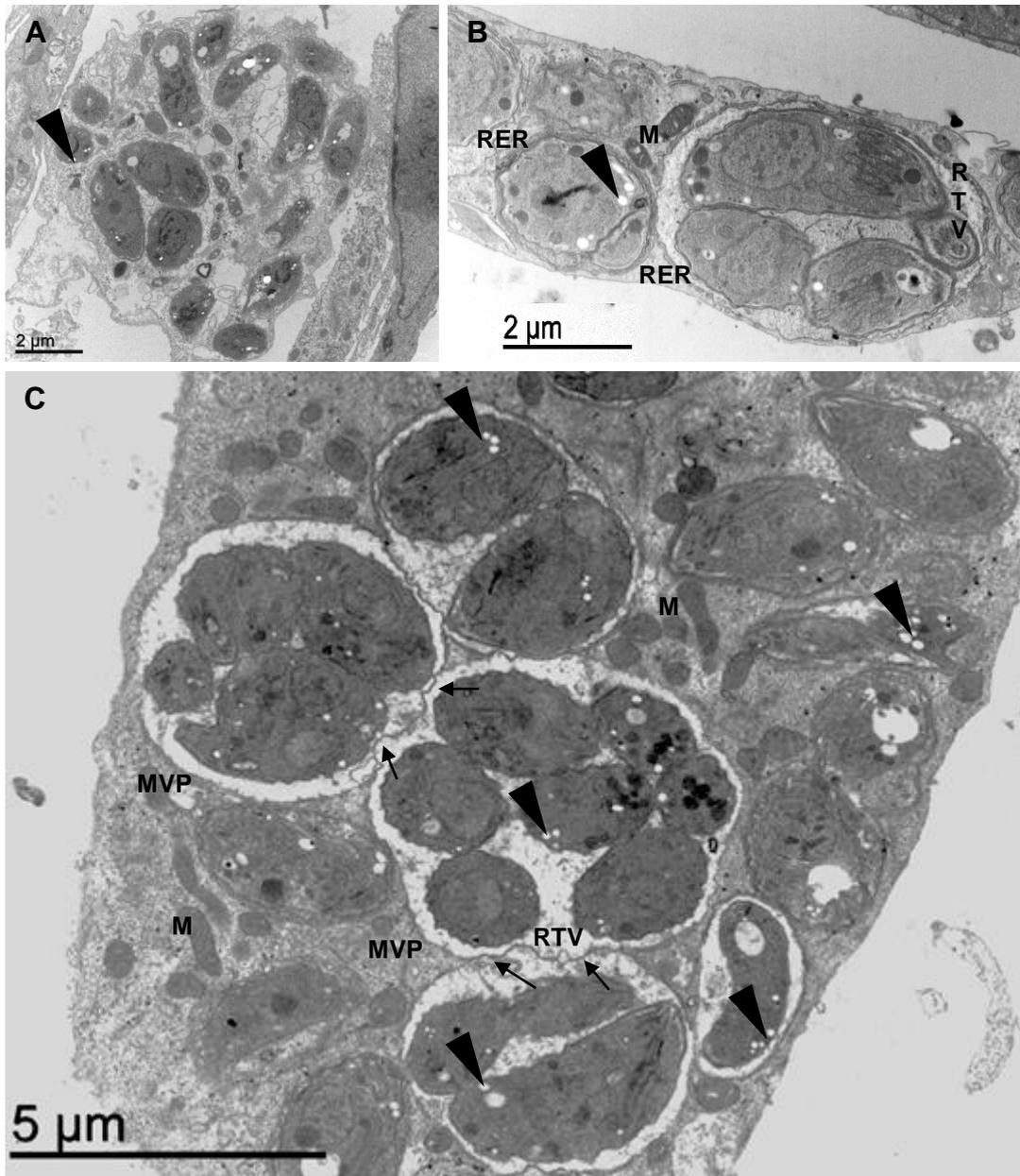


Figura 6.7: Ultraestrutura de células Vero multi-infectadas por *T. gondii* em diferentes etapas de desenvolvimento. Observa-se VP característicos de infecção recente, contendo taquizoítos em conversão para bradizoítos, indicado pela presença grânulos de amilopectina (cabeças de seta) (A-C). Nota-se a manutenção da migração de mitocôndrias (M) e RER em torno desses VP (A-C). Rarefação da rede túbulo-vesicular (RTV) com a matriz adquirindo aspecto granular (A-C). Áreas de contato entre VP com modificação da MVP (C) (setas). Parasito (P)

Cistos em processo de formação podem ser observados na figura 6.8 A e B, com manutenção da associação de perfis de RER e mitocôndrias. O aumento do número de parasitos no interior dessas estruturas é indicativo de maturação desses cistos, que apresentam algumas características morfológicas, como a maior eletrondensidade da parede e da matriz cística, além da maior compactação dos parasitos (Figura 6.8 C e D). A migração de mitocôndrias para o entorno dos cistos em desenvolvimento foi evidente (Figura 6.8 D). Observou-se também, com frequência numa mesma célula, VP contendo taquizoítos ao lado de estruturas císticas (Figura 6.8 D). Uma vez que não houve sincronismo no desenvolvimento da cistogênese intracelular, foi comum observar diferentes estágios de maturação de cistos numa única célula (Figura 6.9 A e B), com a particularidade da alta eletrondensidade da matriz cística em células Vero (Figura 6.9 B e C). Observou-se também incidência da localização muito proximal dos cistos com o núcleo das células (Figuras 6.9 C; 6.11 A; 6.13 A e B).

Um típico cisto maduro desenvolvido *in vitro* mostrando a compactação dos bradizoítos, alta eletrondensidade da matriz e da parede cística e a interação de mitocôndrias e RER com a parede cística pode ser observado nas figuras 6.10 A e 6.11 A, e em detalhe os aspectos dessa interação (Figura 6.10 B). A figura 6.11 B evidencia em maior aumento a associação de RER e mitocôndrias com a parede cística. As imagens da figura 6.11 C-E mostram em detalhe a morfologia da parede cística: altamente invaginada, constituída da membrana e da região granular e com a presença de vesículas na região granular. O cisto maduro apresentou bradizoítos com alta compactação, parede cística bem definida, muitos grânulos de amilopectina, róptrias eletrondensas, grande número de micronemas e núcleo na região posterior do corpo do parasito (Figura 6.12 A e B).

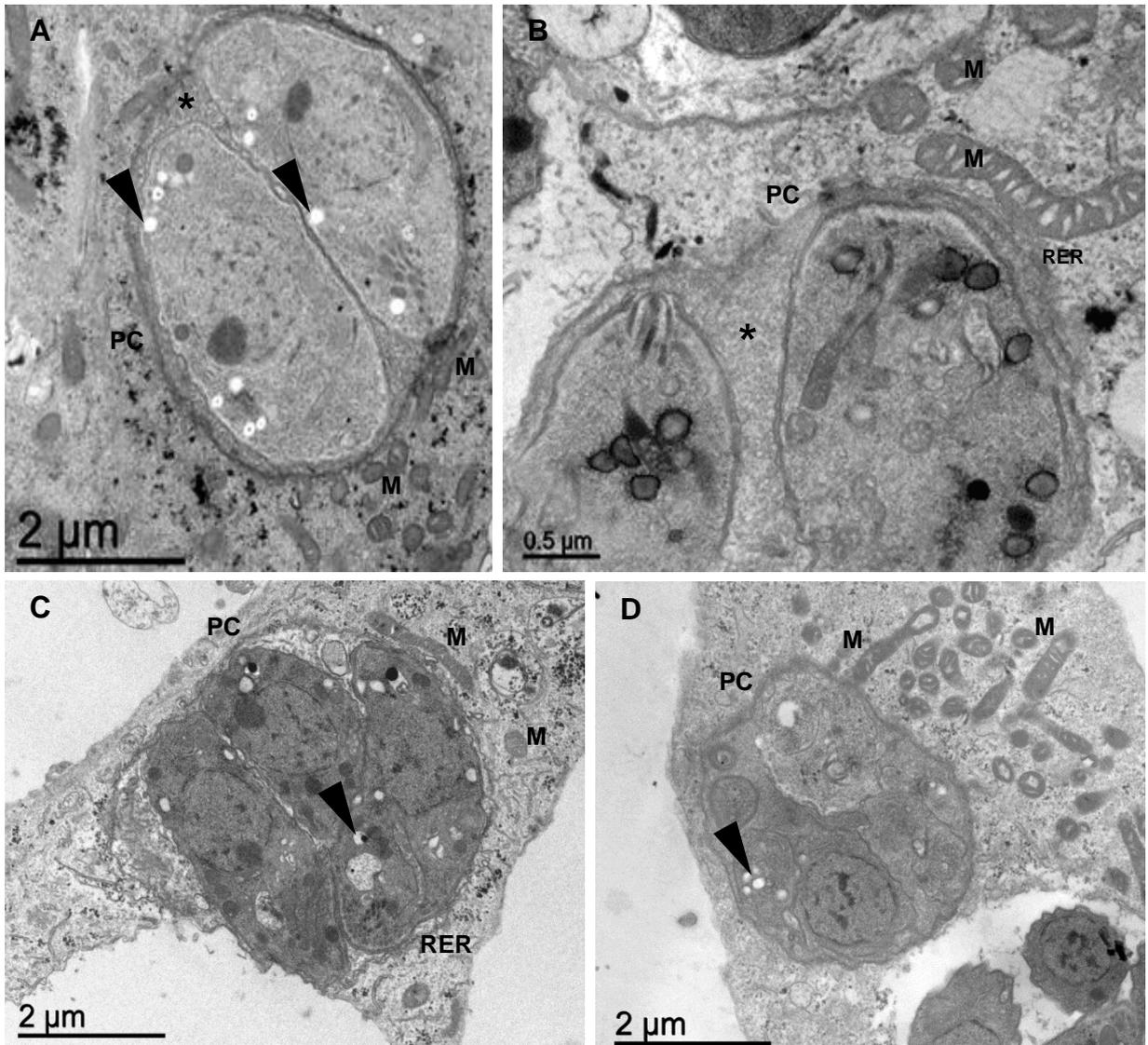


Figura 6.8: Ultraestrutura de células Vero contendo cistos de *T. gondii* no início de sua formação. Os cistos apresentam sua matriz (*) com aspecto granular e maior eletrondensidade, tanto da matriz quanto da parede (A-D). Presença grânulos de amilopectina em bradizoítos (cabeças de seta) e manutenção da migração de mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) em torno dessas estruturas em formação (A-D). Parede cística (PC)

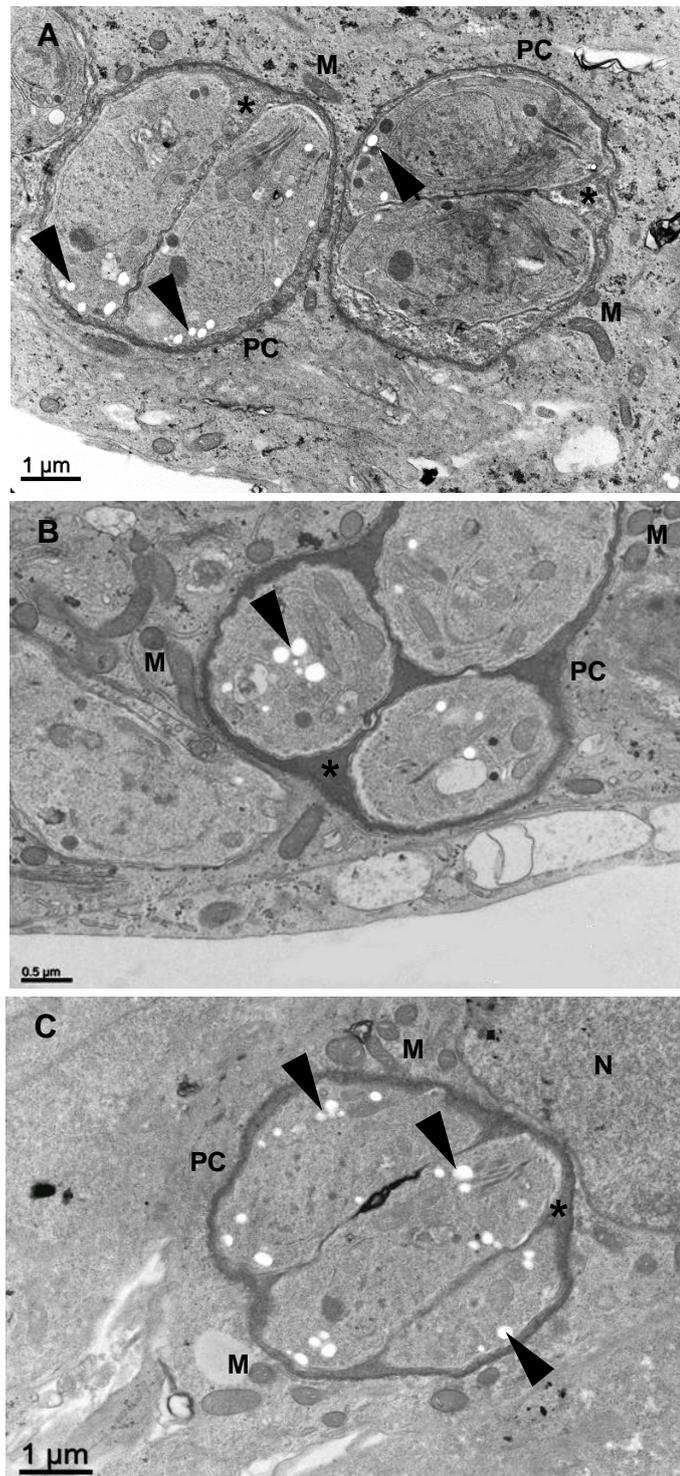


Figura 6.9: Ultraestrutura de células Vero contendo cistos de *T. gondii* em estágio avançado de desenvolvimento. Cistos apresentando matriz (*) mais eletrondensa, característica que auxilia na determinação do estágio de maturação desta estrutura. Presença grânulos de amilopectina em bradizoítos (cabeças de seta) e manutenção de organelas da célula hospedeira interagindo com a parede dos cistos em formação (A-C). Parede cística (PC); Mitocôndria (M); Núcleo da célula hospedeira (N)

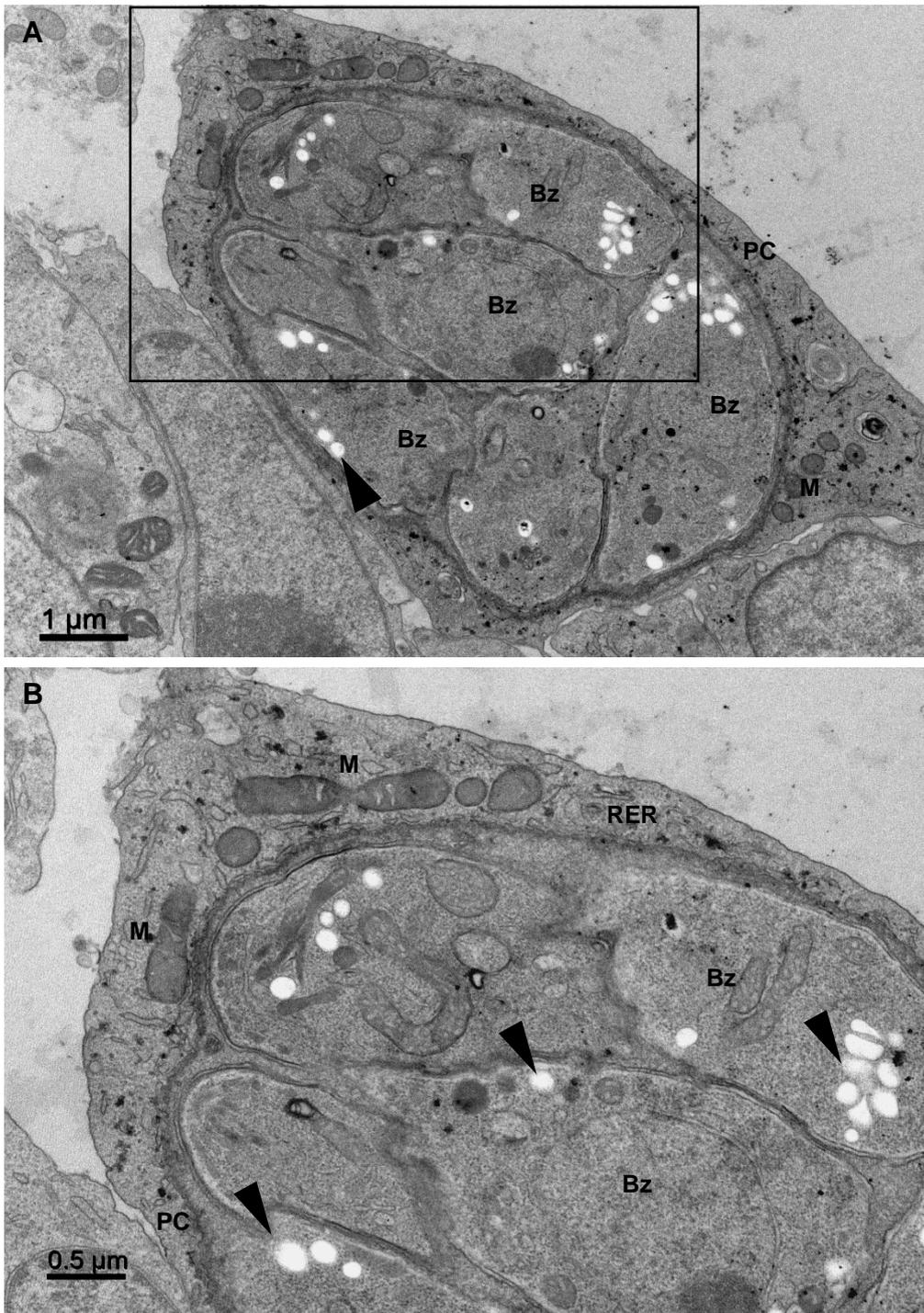


Figura 6.10: Ultraestrutura da célula Vero contendo cisto de *T. gondii* bem desenvolvido. As imagens (A e B) mostram a presença grânulos de amilopectina em bradizoítos (cabeças de seta). Detalhe da parede cística em A, indicando a associação de mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) em torno do cisto (B)

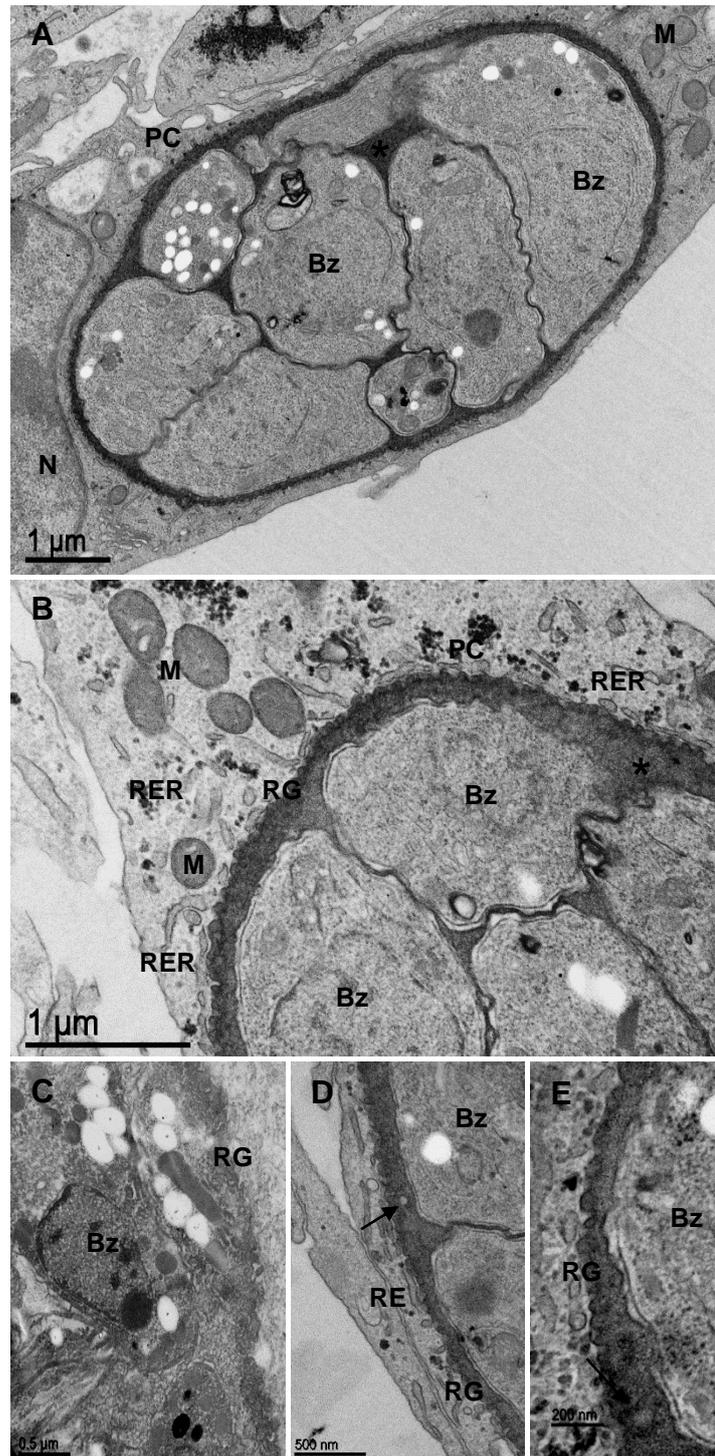


Figura 6.11: Ultraestrutura de células Vero contendo cistos maduros de *T. gondii*. Cistos maduros mostrando alta eletrondensidade da parede e matriz cística (*) (A-E). Evidência em grande aumento da associação de RER e mitocôndrias com a parede cística (B). Detalhes da morfologia da parede cística, com invaginações (C) e presença de vesículas (setas) na região granular (D-E). Bradizoíto (Bz); Parede cística (PC); Grânulos de amilopectina (seta fina); Região granular (RG); Retículo endoplasmático rugoso (RER); Mitocôndria (M); Núcleo da célula hospedeira (N)

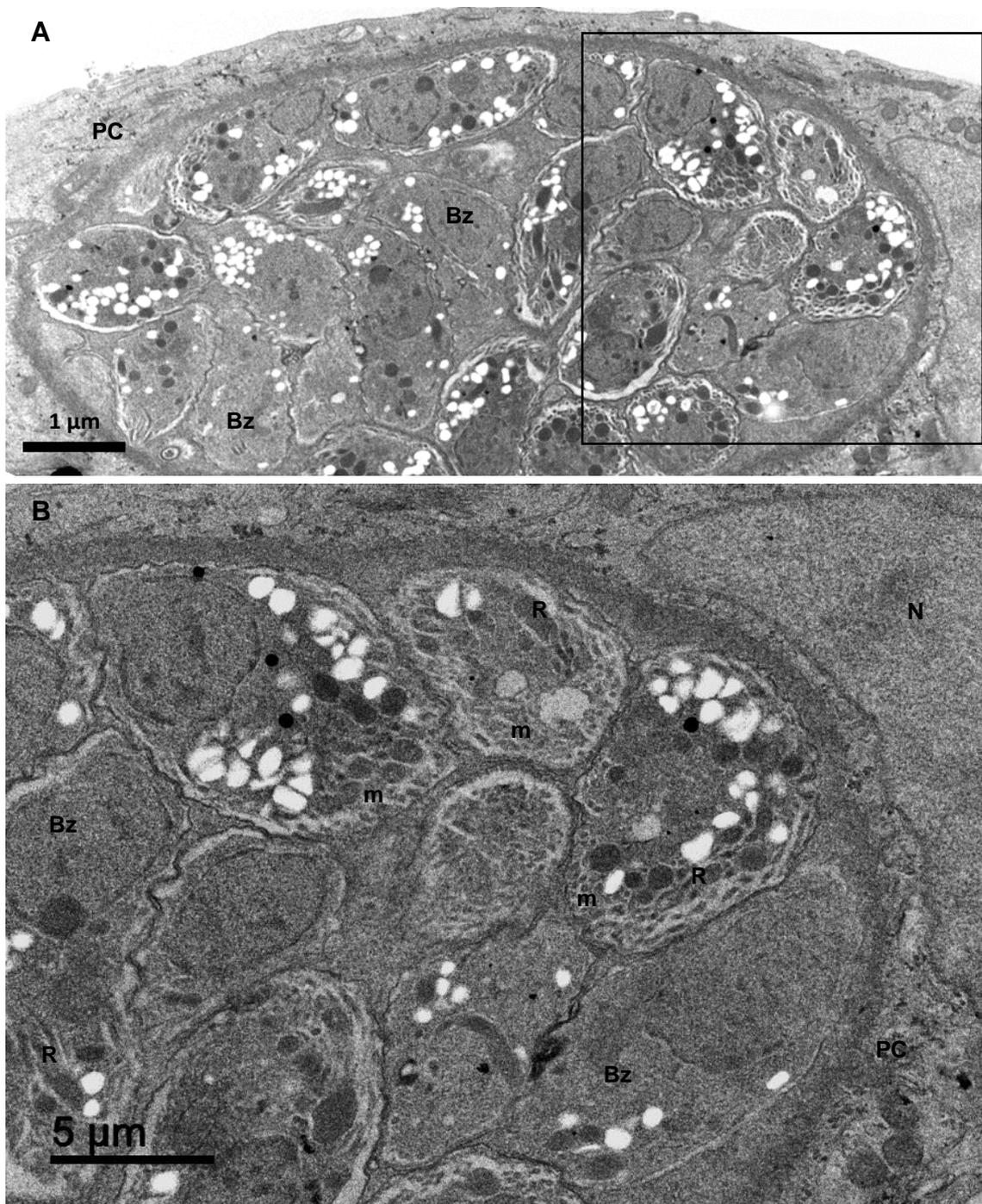


Figura 6.12: Ultraestrutura de cisto maduro de *T. gondii* no interior da célula Vero. Cisto maduro apresentando parede cística (PC) bem definida, bradizoítos (Bz) com alta compactação, muitos grânulos de amilopectina (cabeças de seta), róptrias eletrondensas (R), grande número de micronemas (m) e núcleo na região anterior do corpo do parasito (A e B). B- Maior aumento da região em destaque da figura A. Núcleo do parasito (n); Núcleo da célula hospedeira (N); Retículo endoplasmático rugoso (RER)

VII. DISCUSSÃO

Esta dissertação demonstrou o comportamento diversificado de proteínas do citoesqueleto e de suas proteínas associadas em dois tipos celulares, a célula muscular esquelética e a célula epitelial renal, durante a cistogênese de *Toxoplasma gondii*. Além disso, destacamos o potencial das células da linhagem epitelial renal Vero, como produtoras espontâneas de cistos teciduais em larga escala.

A constatação de que ocorre uma maior incidência de formação de cistos de *T. gondii* em alguns tipos celulares, sugere que esses microambientes apresentam características bioquímicas que favoreçam a persistência do parasitismo no hospedeiro. Este é o caso da CME e dos neurônios, cujo desenvolvimento de cistos nestes tecidos já está bem estabelecido tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo* (Lüder *et al.*, 1999; Di Cristina *et al.*, 2008; Melzer *et al.*, 2010; Tákacs *et al.*, 2012; Swierzy e Lüder, 2015). Nosso grupo foi pioneiro no emprego de CME de murinos, derivadas de cultura primária, como modelo de estudo da cistogênese espontânea de *T. gondii*, a partir da infecção com taquizoítos e bradizoítos de cepas com perfis genéticos distintos (Andrade *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2008, 2009; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a, b; Gomes *et al.*, 2011, 2014). Estes estudos se revestem de importância considerando-se as CME na participação da manutenção do parasito na natureza e do seu papel como uma das principais vias de transmissão do parasito, por meio da ingestão de carne crua ou malpassada.

A escassez de informação sobre o comportamento do citoesqueleto da célula hospedeira durante o estabelecimento da cistogênese de *T. gondii* foi a motivação para o desenvolvimento desta dissertação. Até o momento, poucos trabalhos abordam o papel do citoesqueleto durante o desenvolvimento intracelular do parasito, restringindo-se à análise de microtúbulos e filamentos intermediários durante o ciclo lítico de *T. gondii* (Halonen e Weidner, 1994; Andrade *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001; Sehgal *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2008). Considerando-se que o citoesqueleto pode atuar como um importante agente “colaborador” para a permanência do parasito no interior da célula hospedeira, ao longo de todo o período da infecção, quiçá por toda a vida do hospedeiro, compreender sua adaptação ao parasitismo/cistogênese, justifica plenamente essa abordagem no presente trabalho.

Visando adequar essa questão à reprodutibilidade do estabelecimento da cistogênese *in vivo*, a opção pelo emprego de CME, como o principal alvo deste estudo, se pautou no seu reconhecido papel como mantenedora da infecção nos seus hospedeiros. Assim, a linhagem celular de CME derivada de murino (C2C12) originalmente obtida por Yaffe e Saxel (1977) foi uma das células utilizadas ao longo deste trabalho. Este subclone diploide possui a capacidade de se diferenciar e produzir miotubos sob condições favoráveis, expressando proteínas músculo-específicas (Blau *et al.*, 1985).

Uma das condições para a manutenção de subculturas de células C2C12 é o controle da sua confluência para evitar a diferenciação celular, com o estabelecimento da miogênese, esgotando-se assim, a população de mioblastos. Então, para que a miogênese fosse bem-sucedida, foram avaliados neste trabalho alguns parâmetros que estimulassem esse processo, dentre eles a influência da densidade celular. Inicialmente, o emprego de quatro densidades celulares distintas (5×10^4 ; $6,25 \times 10^4$; $7,5 \times 10^4$ e 1×10^5 células) demonstrou que, ao final de 168 h de indução da miogênese, o inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células foi aquele que apresentou o maior percentual de miotubos. Algumas considerações merecem destaque com relação a esses resultados, pois foi estabelecido que a relação entre a densidade celular e a miogênese de CME é determinante para seu sucesso: quanto maior a densidade, maior o grau de diferenciação apresentado pelas células (Angelis *et al.*, 1998; Lindon *et al.*, 2001; Kaspar *et al.*, 2005; Chowdhury *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2011). Os fatores moleculares, que garantem o sucesso da miogênese, são a promoção do contato célula-célula, dependente da maior expressão de α -actina esquelética e miogenina (Lindon *et al.*, 2001; Kaspar *et al.*, 2005) e a retirada das células do ciclo proliferativo, por meio da expressão da proteína p21, um inibidor da progressão do ciclo celular (Tanaka *et al.*, 2011). No entanto, nossos resultados mostraram que existem limitações no aumento exagerado do número de células no inóculo primário, que passarão a ser discutidos a seguir. O emprego de 1×10^5 células, nas nossas condições experimentais, não foi capaz de estabelecer a maior formação de miotubos dentre os inóculos testados, pois ocorreu o destacamento das células da culturas ao longo do experimento. Este fato também comprometeu os experimentos adicionais de monitoramento da cistogênese de *T. gondii* (pelo menos no tempo de 120 h), uma das propostas deste trabalho. Todavia, a população de células mononucleadas manteve-se praticamente

constante, indicando a capacidade dessas células de se multiplicar, mesmo sob as condições indutoras do meio (diminuição da concentração de SFB e inserção do SC), conforme adaptação do protocolo original de Yaffe e Saxel (1977).

Baseando-se nos resultados obtidos a partir da variação da densidade celular, avaliamos a influência do cálcio em culturas com inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células. Nosso objetivo foi verificar fenotipicamente a influência da concentração deste íon durante a miogênese de C2C12. Essa abordagem foi baseada no conhecimento de que o cálcio está diretamente relacionado ao processo de diferenciação das CME, uma vez que é pré-requisito para a expressão de moléculas de adesão celular envolvidas na fusão de membranas, como as caderinas. Na diferenciação terminal da CME de mamíferos, dois membros da família das caderinas, M-caderinas e N-caderinas, têm sido identificados. A M-caderina é encontrada em maior quantidade em células satélites e mioblastos do tecido muscular desempenhando papel-chave no reconhecimento inicial entre mioblastos/miócitos para formar miotubos multinucleados (Charrasse *et al.*, 2006; Hsiao e Chen, 2010). A expressão das M e N-caderinas diminuem durante o processo de diferenciação e da miogênese de CME (Mège *et al.*, 1992; Irintchev *et al.*, 1994; Eng *et al.*, 1997; Kaufmann *et al.*, 1999; Curci *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2011). Nós testamos duas concentrações de CaCl_2 : 7 e 10 mM, a fim de identificar aquela concentração que induzisse a maior taxa de miogênese. A análise quantitativa destas culturas mostrou que a maior concentração de CaCl_2 melhorou o desempenho da diferenciação celular, com a formação de mais miotubos ao final de 168 h. Como a expressão de caderinas é dependente da concentração de cálcio (Hsiao e Chen, 2010), esta estratégia experimental confirmou a influência deste íon na fusão de células e consequente formação de miotubos.

Outra abordagem empregada para aumentar a indução da formação de miotubos/miofibras foi adicionar insulina às culturas. A insulina induz a miogênese em C2C12 através das vias PI3-quinase/p70S6-quinase e p38-MAPK (NF- κ β), inibindo a sinalização promovida por p44/p42-MAPK (AP-1) (Conejo *et al.*, 2001). A adição de 100 UI/ml de insulina humana nas culturas de C2C12 com densidade celular de $7,5 \times 10^4$ e 10 mM CaCl_2 levou ao aumento da produção de células multinucleadas, chegando a formação de 40% de miofibras ao final de 168 h de indução da miogênese. O tratamento de culturas de mioblastos com insulina de diferentes fontes e concentração tem sido relatado induzindo à formação de

miotubos/miofibras pela queda drástica do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e concomitante aumento de p21, alvo do MyoD, uma proteína que tem um papel importante na regulação da diferenciação do músculo (Conejo *et al.*, 2001; Ariga *et al.*, 2008). Em suma, todas as estratégias experimentais que empregamos neste trabalho foram baseadas no conhecimento acumulado da biologia de CME e permitiram a obtenção de culturas enriquecidas em miotubos/miofibras e aptas para as análises subsequentes do impacto da cistogênese de *T. gondii* sobre o citoesqueleto da CME.

Como mencionado anteriormente, a CME e os neurônios, são considerados os tipos celulares de eleição para o estabelecimento da fase crônica da toxoplasmose, com a formação de cistos teciduais de *T. gondii*. Mais recentemente, tem sido imputado que células diferenciadas seriam o nicho mais adequado para a cistogênese, justificando a seleção pelo parasito de CME e neurônios para a manutenção do parasitismo no hospedeiro (Swierzy e Lüder, 2015). Contudo, a eficiência da conversão de taquizoítos em bradizoítos em algumas linhagens de células epiteliais renais não conjuga com essa hipótese, dado o potencial de produção de cistos nestas células, frente a diferentes formas infectantes e cepas de diversificado perfil genético (Weilhammer *et al.*, 2012; Paredes-Santos *et al.*, 2013; de Munoz *et al.*, 2014, 2015).

A susceptibilidade da célula Vero à infecção pelo *T. gondii* tem estimulado seu emprego para a manutenção de taquizoítos de diferentes cepas (Saadatnia *et al.*, 2010; Sivrikaya e Bağrıaçık, 2011; da Costa-Silva *et al.*, 2012). A formação de cistos teciduais neste tipo celular foi relatada por Soête e Dubremetz (1996). Esses autores detectaram antígenos específicos para bradizoítos (BAG-1) e formação de estruturas císticas em culturas infectadas com taquizoítos de *T. gondii* de uma cepa do tipo I, quando submetidas a estresse físico e metabólico, indicando o potencial deste tipo celular na formação de cistos teciduais. Weilhammer *et al.* (2012) demonstraram que a cistogênese em células Vero de uma cepa do tipo II de *T. gondii* era condicionada a baixas concentrações de CO₂. Apesar da ampla utilização de manobras experimentais para a indução da diferenciação do parasito *in vitro*, Soête *et al.* (1993) demonstraram a capacidade desta linhagem celular em formar VP mistos (contendo bradizoítos e taquizoítos) e cistos espontaneamente quando células Vero são infectadas com taquizoítos de uma cepa do tipo II. Nosso grupo já demonstrou que a infecção da linhagem epitelial renal de felino CRFK com bradizoítos da cepa

ME-49, a mesma cepa usada nesta dissertação, foi mais eficiente no estabelecimento da cistogênese quando comparada à linhagem epitelial intestinal de rato IEC-6 (de Muno *et al.*, 2014). Mais recentemente, empregando células Vero, nosso grupo reproduziu esse processo, a partir da infecção com bradizoítos da cepa ME-49, reforçando seu papel como produtora de cistos (de Muno, 2015). Paredes-Santos *et al.* (2013) observaram diversificada capacidade de formação de cistos teciduais em diferentes tipos celulares infectados a partir de uma cepa híbrida tipo I/III. O estudo comparou uma linhagem epitelial renal de macaco (LLCMK₂) a um fibroblasto (HFSF) e uma glia (C6) infectadas com taquizoítos e os resultados mostraram que a célula epitelial foi a mais eficiente na formação de cistos espontaneamente. Esse conjunto de dados corroboraram nossos resultados quanto à alta infectividade das células Vero frente a taquizoítos da cepa tipo II e sua capacidade em formar cistos, assim como as CRFK, que também são do tipo epitelial renal. Esses resultados parcialmente conflitantes com os de Weilhammer *et al.* (2012), não se relacionam com o genótipo das cepas utilizadas, considerando-se que nos nossos ensaios utilizamos cepas do tipo II. A variável que difere os nossos resultados dos desses autores foi o tipo celular empregado para a manutenção do parasito: no nosso trabalho a própria linhagem Vero foi utilizada como fonte de taquizoítos da cepa de *T. gondii*. Assim, a influência do microambiente celular e dos fatores moleculares intrínsecos e extrínsecos, que possam conduzir à cistogênese em células epiteliais, ainda não foram desvendados, e nem foi esclarecido se essas células são também responsabilizadas pela manutenção de cistos nos sistemas *in vivo*.

Numa outra vertente, com base nesses resultados e na nossa experiência com células Vero, nos estudos da interação parasito-célula hospedeira, essa linhagem epitelial foi selecionada como modelo celular para a produção em larga escala de cistos de *T. gondii*. Assim, demonstramos que células Vero, cultivadas em garrafas de 25 cm² e infectadas com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*, após 120 h de infecção com a relação parasito-célula hospedeira (3:1), produziram em média 20 mil cistos por frasco de cultura, sem a necessidade de qualquer modulação física e/ou química dessas culturas. Nossos dados indicaram a alta capacidade das células Vero em estabelecer a cistogênese, espontaneamente. A obtenção desses cistos foi dependente da carga parasitária empregada e do tempo de infecção. A menor relação parasito-célula (3:1) e o menor tempo de infecção (120 h)

empregados nesses ensaios favoreceram a formação de cistos. Paredes-Santos *et al.* (2013), de Muno *et al.* (2014) e de Muno (2015) também avaliaram a susceptibilidade e a capacidade do estabelecimento espontâneo da cistogênese em linhagens epiteliais renais, a partir de cepas com perfis genéticos diferentes, porém estes autores não focaram na utilização dessas células como produtoras de cistos de *T. gondii*, abordagem empregada na presente dissertação.

Aqui estabelecemos um protocolo experimental que permite a obtenção em larga escala de cistos de *T. gondii* a partir da infecção de células Vero, minimizando a utilização de animais experimentais e reforçando o atendimento ao princípio dos 3Rs (“reduction” = redução, “refinement” = refinamento, “replacement” = substituição). De acordo com o protocolo de isolamento de cistos utilizado pelo nosso grupo, o período entre a inoculação de *T. gondii* no camundongo (linhagem C57BL/6) e a obtenção de cistos do cérebro, que foi em torno de 30 a 45 dias, permite o isolamento em média de 2-4 mil cistos teciduais por animal. *In vitro*, no entanto, como observado em nossos experimentos, após 120 h obtivemos uma média de 20 mil cistos por garrafa de 25 cm² contendo 2 x 10⁶ células Vero. Para produzir este montante de cistos, *in vivo*, seriam necessários cerca de 8-10 animais e de um longo período de tempo para o isolamento e purificação das formas císticas. Assim, podemos listar as principais vantagens desta abordagem de desenvolvimento biotecnológico: (i) redução do tempo de obtenção das formas (cistos e bradizoítos); (ii) eliminação do uso de animais experimentais; (iii) isolamento de cistos de forma rápida; e (iv) alto grau de purificação das formas obtidas. Contudo, é preciso considerar ainda a necessidade de ensaios biológicos em animais experimentais, para testar a capacidade infectiva dos cistos e bradizoítos obtidos de cultura de células Vero, visando validação deste método.

Esse conjunto de dados estimula aprofundar os estudos da cistogênese de *T. gondii* na linhagem Vero, para explorar por análise bioquímica, o metabolismo energético deste modelo celular que pudesse explicar a ocorrência da cistogênese nesta célula, que teoricamente não é de eleição para formação de cistos no sistema *in vivo*. Essa proposta tem por base os estudos de Weilhammer *et al.* (2012) demonstrando que moléculas de baixo peso, dentre elas o lactato, um metabólito da via glicolítica, estão presentes no sobrenadante de células resistentes ao desenvolvimento de bradizoítos. Outro dado apontado neste estudo é a capacidade destas moléculas em tornar refratárias à diferenciação do parasito células ainda não

infectadas. Além disso, há modulação negativa do ciclo celular da célula hospedeira pelo parasito, detendo-o entre as fases G2/M (Brunet *et al.*, 2008; Molestina *et al.*, 2008). A caracterização inicial de um fator responsável por esta modulação indicou uma proteína lábil maior que 10 kDa secretada pelas células infectadas. Este fator age sobre as células vizinhas não-infectadas, sugerindo a ação extrínseca do parasito sob estas potenciais células-alvo, tornando-as susceptíveis à infecção (Lavine e Arrizabalaga, 2008). Isso indica fortemente que o metabolismo energético da célula é mais um fator que influencia no desenvolvimento da cistogênese de *T. gondii*.

No que se refere à análise ultraestrutural da célula Vero, características morfológicas do tecido epitelial foram observadas, pela presença de microvilosidades, células justapostas e polarização celular. Como evidenciado neste estudo, as células Vero apresentaram elevado número de organelas como mitocôndrias, RER e complexo de Golgi (Detrisac *et al.*, 1984). A evidenciação do grande número de mitocôndrias demonstrado neste trabalho ratifica uma das características fenotípicas do tecido epitelial do córtex distal do rim: o fornecimento de energia para o transporte ativo necessário para os processos de secreção e absorção.

As análises por MET de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii* foram realizadas por períodos que variaram de 168-216 h de interação, fornecendo dados de eventos não sincrônicos da infecção e permitindo o acompanhamento do processo de cistogênese neste tipo celular. Identificamos (i) VP característicos de infecção recente, apresentando um taquizoíto no seu interior; (ii) VP contendo parasitos em duplas, indicativo de processo de divisão celular, e/ou apresentando vários parasitos por VP; (iii) VP com parasitos em processo de transição de taquizoíto para bradizoítos e, (iv) cistos teciduais em diferentes estágios de maturação.

O recrutamento/deslocamento de organelas como mitocôndrias e RER foi evidenciado para o entorno de VP, VP com formas em transição e cistos de *T. gondii*. A associação de organelas da célula hospedeira com a membrana do VP (MVP) durante a interação de *T. gondii* derivado de cepas com diversificado perfil genético e em diferentes tipos celulares, já foi descrita na literatura (Sinai *et al.*, 1997). O recrutamento dessas organelas ocorre rapidamente após a invasão do parasito (revisto em Sinai, 2008; Nolan *et al.*, 2015). Especula-se que a célula

hospedeira forneça lipídeos e produtos do metabolismo intermediário para os parasitos intracelulares, para sustentar, tanto a construção, quanto a manutenção perene da fase crônica da toxoplasmose (Sinai *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Coppens *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014).

Nosso modelo celular dispõe de grande quantidade de mitocôndrias, mostrando-se adequado para avaliar esse tipo de associação. Em células não infectadas, as mitocôndrias apresentaram distribuição longitudinal, preferencialmente ao eixo principal celular, sendo este perfil alterado após o estabelecimento do VP. Células infectadas vistas por MET mostraram a migração de mitocôndrias com reorganização espacial em torno do VP em células contendo diferentes estágios de infecção e a manutenção desta associação quando os cistos estão formados. O único estudo que abordou a associação de organelas com a parede cística durante a cistogênese, *in vitro*, foi o realizado por Lindsay *et al.* (1993) os quais infectaram fibroblastos humanos de pele (Hs68) com vários isolados de *T. gondii*. Nesse estudo, os autores compararam a cistogênese a partir de diferentes isolados e tipos celulares e não obtiveram êxito com uma cepa do tipo I (RH), a partir da infecção com taquizoítos. Isso difere dos resultados do nosso grupo que mostrou a geração de bradizoítos espontaneamente em CME, *in vitro*, utilizando taquizoítos da cepa RH (Ferreira-da-Silva *et al.*, 2009). As imagens eletrônicas publicadas nos estudos de Lindsay *et al.* (1993) mostraram vacúolos com uma estrutura achatada e uma matriz bastante eletrondensa associada tanto aos VP quanto à parede cística (PC). Identificar essas estruturas como mitocôndrias estaria fora dos padrões morfológicos dessas organelas, que são mais compatíveis com perfis de RE. Além disso, dada a limitação da área de observação do cisto, mostrada no referido artigo, restrito a uma única imagem e com grande ampliação da mesma, não foi possível observa se mitocôndrias típicas estariam associadas ou se o RER de morfologia padrão estivessem também interagindo com a parede cística.

As imagens inéditas, da movimentação direcionada das mitocôndrias e RER para os cistos, obtidas no presente trabalho são bastante contundentes indicando que esse processo representa uma resposta celular à invasão e à manutenção do *T. gondii* intracelular, tanto no estágio de multiplicação celular (taquizoíto e bradizoíto) quanto em cistos já estabelecidos. Este tópico tem sido bem caracterizado com taquizoítos (Jones *et al.*, 1972; Sinai *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Magno *et al.*, 2005b; Gomes *et al.*, 2014) mas, ainda permanece um assunto muito pouco

explorado em se tratando do estabelecimento da cistogênese nas células hospedeiras. Consideramos que essa movimentação de mitocôndrias não seria uma casualidade e muito provavelmente deve envolver vias de sinalização do parasito para esta atração. Desse modo, nossa hipótese enfraquece a sugestão de alguns autores, como Magno *et al.* (2005) por exemplo, de que essa localização de mitocôndrias seria acidental, consequência da falta de espaço durante o desenvolvimento do parasito na célula hospedeira.

O tropismo das mitocôndrias da célula hospedeira para a região onde se localiza o VP é uma questão ainda não esclarecida. Recentemente foi sugerido que a adesão dessa organela à superfície do VP é mediada por TgMAF1 (fator 1 de associação mitocôndria-parasito) (Pernas *et al.*, 2014). Essa proteína foi encontrada sendo expressa em taquizoítos das cepas dos tipos I e III, mas não naquelas do tipo II. Contudo, os mesmos autores relatam o recrutamento de mitocôndrias para a MVP em células infectadas com taquizoítos da cepa ME-49, resultados que corroboram com os descritos no presente trabalho. Estudos anteriores sugeriram que a proteína TgROP2, uma das proteínas das róptrias, poderia interagir com as mitocôndrias do hospedeiro, uma vez que é ancorada à MVP por meio de interações hidrofóbicas e iônicas e contém um sinal de endereçamento para a matriz mitocondrial (Labesse *et al.*, 2009; Sinai e Joiner, 2001). Para testar se ROP2 exercia papel crucial na associação mitocôndrias-MVP, foram criadas linhagens deficientes em ROP2a, b e ROP8. Os resultados sugeriram fortemente que nenhuma dessas três proteínas estariam envolvidas na associação mitocôndrias-MVP (Pernas e Boothroyd, 2010). Independentemente dessa discussão a respeito da(s) molécula(s) responsável(eis) pela associação entre mitocôndrias da célula hospedeira e o VP, nossos dados não só comprovam esta associação, como também reforçam a ideia de que esse evento não seria ocasional.

A análise dos cortes ultrafinos apontaram dois mecanismos distintos de associação das mitocôndrias com VP e cistos: (i) via adesão direta com a MVP ou PC, sem que se observe uma região da mitocôndria preferencial para que esta adesão se estabeleça e, (ii) indireta, mediada por RER ou REL. Jones *et al.* (1972) e Sinai e Joiner (1997) demonstraram que essa associação sempre se estabelecia de forma direta em macrófagos. Muito embora a presença de RER circundando os VP fosse comum nas micrografias destes autores, esse tipo de associação não foi descrita. O relato da presença de perfis de RER em associação à MVP foi realizado

por Magno *et al.* (2005), utilizando uma célula epitelial renal (LLCMK₂) como modelo de estudo. No que se refere à associação PC-mitocôndria, o único dado disponível na literatura foi descrito por Lindsay *et al.* (1993) em cistos dentro de fibroblastos. Mais recentemente, nosso grupo mostrou essa dinâmica de organelas em CME infectadas com bradizoítos (de Oliveira, 2014), sem, no entanto, avaliar com detalhes essa associação com cistos, como foi descrito no presente trabalho.

Durante o período de desenvolvimento de taquizoítos no vacúolo, ocorreu um aumento gradativo da rede túbulo-vesicular (RTV) à semelhança do que tem sido descrito em outras células epiteliais renais, como a LLCMK₂ (Magno *et al.*, 2005; Lemgruber *et al.*, 2008). Além de permitir a difusão bidirecional de moléculas entre o VP e o citoplasma da célula hospedeira (Cesbron-Delauw, 1994; Schwab *et al.*, 1994), foi sugerido que a RTV funcione como um suporte mecânico para *T. gondii* (Magno *et al.*, 2005). Observamos também, áreas de contato entre vacúolos mostrando modificação na MVP, sugerindo uma possível fusão entre estas membranas. Imagens de CME descritas por de Oliveira (2014) apresentaram múltiplos VP com estreito contato entre suas membranas, com imagens sugestivas de fusão ou perda da integridade das mesmas. No presente trabalho não fomos capazes de garantir a ocorrência de comunicação entre esses vacúolos, sendo necessário um estudo sistemático de análise de cortes ultrafinos seriados para validar ou não essa hipótese.

O processo de cistogênese de *T. gondii* na célula Vero foi acompanhado por imagens de MET através da identificação de estruturas em diferentes estágios de maturação. Os parasitos presentes no interior dos cistos teciduais apresentaram características típicas de bradizoítos, como grande quantidade de grânulos de amilopectina, assim como aqueles descritos por Dubey *et al.* (1998). Foi possível visualizar também o aumento da eletrondensidade tanto da estrutura da parede quando da matriz cística à medida que estes cistos amadureciam. Essas observações estão de acordo com a descrição da maturação de cistos nos sistemas *in vivo* e *in vitro* (Ferguson e Hutchison, 1987; Paredes-Santos, 2015). Durante o processo de cistogênese observou-se a escassez de RTV, que por mecanismos ainda não esclarecidos, parece ser degradada e substituída por um material amorfo, granular e eletrondenso, caracterizado como a matriz cística. No caso em particular das células Vero, esse aumento da eletrondensidade é bastante considerável, o que

difere da descrição morfológica de cistos desenvolvidos em outros tipos celulares, incluindo as CME. O significado biológico desse evento permanece ainda obscuro.

Diante desses resultados e do excelente desempenho de células Vero durante o estabelecimento da cistogênese, resolvemos incluí-las na análise do comportamento dos elementos do citoesqueleto da célula hospedeira durante o processo de cistogênese de *T. gondii*. Assim, foi possível analisar o mesmo evento de forma comparativa em um modelo de eleição para a formação de cistos e em outro ainda não considerado como um sítio de predileção para a formação de cistos, *in vivo*.

Durante o processo de infecção em alguns tipos celulares o *T. gondii* pode seguir duas vias de destino intracelular: o ciclo lítico ou a cistogênese. Nós temos acumulado conhecimento de que alguns fatores determinantes que regem a opção por uma dessas vias são, além do tipo celular, o tamanho da carga parasitária, a forma infectante e o tipo de cepa do parasito (Guimarães *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2009; de Muno *et al.*, 2014, de Muno, 2015). Em função desses parâmetros, a infecção primária nos nossos modelos optou pela relação parasito-célula hospedeira de 3:1, possibilitando a análise do processo de cistogênese.

A primeira proteína do citoesqueleto avaliada no presente trabalho foi a actina, por meio do composto Faloidina, que revela somente a actina filamentosa, comum às CME e às células Vero. A análise dos microfilamentos de actina, por microscopia de fluorescência, não permitiu detectar qualquer alteração no padrão de distribuição desta proteína durante a cistogênese nas CME. Acreditamos que o emprego de uma ferramenta de análise mais refinada, como a microscopia de super-resolução, possibilitaria a melhor visualização da participação dos microfilamentos durante esse evento de diferenciação do parasito. O único relato de análise estrutural dos filamentos de actina na CME foi realizado por Gomes (2011), após a infecção dessas células com taquizoítos de uma cepa do tipo I de *T. gondii*. O autor descreveu alterações na organização e distribuição dos filamentos em mioblastos e miotubos após 24 h de interação. Essas alterações mostraram um grande espaçamento entre os microfilamentos que poderiam favorecer o egresso do parasito da célula hospedeira.

Em células Vero, nenhuma modificação no perfil de distribuição dos microfilamentos de actina foi observada durante o desenvolvimento intracelular de *T. gondii*, e não existe qualquer referência de estudos anteriores que pudessem ser

comparados. No entanto, foi descrito na literatura uma relação do sucesso da replicação do vírus dengue do tipo 2 com os filamentos de actina, uma vez que a despolimerização destes filamentos acarreta na diminuição da taxa de replicação viral (Orozco-García *et al.*, 2016). Nossos resultados apontando a não influência no perfil de organização de microfilamentos de actina, durante o estabelecimento da cistogênese em células Vero, tem por base a análise da conjugação da microscopia de fluorescência e ApoTome, gerando cortes no eixo Z que foi capaz de fornecer imagens mais definidas do citoesqueleto. Desta forma, a manutenção da estrutura dos microfilamentos de actina em células Vero, onde a cistogênese está se estabelecendo ou o cisto já está formado, vem de encontro à ideia da necessidade da integridade funcional e estrutural da célula hospedeira durante a fase crônica da infecção.

Outro componente do citoesqueleto analisado foi o microtúbulo. Estes foram avaliados através da detecção da subunidade de β -tubulina, que também permitiu a visualização dos microtúbulos nas regiões apical e subpelicular do parasito (revisto em de Souza *et al.*, 2010). O remodelamento nos microtúbulos em células Vero foi observado apenas nas células que continham cistos. Uma vez que nossa avaliação foi realizada a partir de 72 h de infecção, nossos resultados neste modelo celular estão de acordo com achados de Melo *et al.* (2001), que relataram a perda do remodelamento da β -tubulina na periferia de VP de células Vero nesse mesmo período de tempo de interação. Andrade *et al.* (2001) e Gomes (2011) também relataram a disposição dos microtúbulos ao redor de VP de microtúbulos em tempos curtos de infecção (24 h) e ambos os trabalhos relacionaram a reorganização da tubulina com a estabilização estrutural da MVP. Na CME a alteração no perfil de distribuição da tubulina foi dependente do estágio de diferenciação da célula hospedeira: em células mononucleadas, os microtúbulos foram encontrados ao redor dos cistos, enquanto a reorganização da tubulina foi ausente em microtúbulos/miofibras. Uma vez que não há relatos da disposição dos microtúbulos em tempos longos de infecção, podemos sugerir que a reorganização citada por Andrade *et al.* (2001) e Gomes (2011) em VP de microtúbulos com 24 h de interação se perde ao longo da infecção, assim como relatado por Melo *et al.* (2001) em células Vero. Nossa hipótese é que a reestruturação da tubulina encontrada nas CME mononucleadas e nas células Vero contendo cistos de *T. gondii* esteja relacionada à sustentação e a garantia da permanência do cisto intacto no interior da célula

hospedeira ao longo da fase crônica da toxoplasmose. Têm sido proposto que a manutenção do parasito intravacuolar e a aquisição de nutrientes ocorrem por uma simples difusão bidirecional de moléculas de até 1,3 kDa entre o VP e o citoplasma da célula hospedeira, com a formação de poros (Schwab *et al.*, 1994). Um mecanismo alternativo para esse processo foi apontado por Coppens *et al.* (2006) e Walker *et al.* (2008) introduzindo a participação de microtúbulos neste processo.

Acreditamos que em miotubos/miofibras a estabilidade dos cistos por meio da reorganização drástica dos microtúbulos não seria necessária, visto que o citoesqueleto de células altamente diferenciadas forma um complexo arcabouço estrutural dando suporte físico ao cisto de *T. gondii*, sem a necessidade de alterar o perfil de distribuição da tubulina. Não podemos excluir a possibilidade de que ocorra um sutil remodelamento da tubulina ao redor dos cistos que pode não ter sido revelado com a ferramenta de análise utilizada neste estudo.

A complexa organização do citoesqueleto do músculo estriado esquelético requer uma rede dinâmica por toda a célula, capaz de interagir com estruturas celulares vitais, atuando como agente mecano-químico visando à coordenação intra- e intercelular de todas essas funções. Um bom candidato para orquestrar essa organização é o filamento intermediário de desmina. Mutações e modificações pós-traducionais na desmina altera essa rede de filamentos, levando à perda de sua função e das outras proteínas e organelas a ela associadas, gerando efeitos tóxicos com a formação de agregados de desmina (revisto em Capetanaki *et al.*, 2015). À luz desse conhecimento, no presente trabalho relatamos tanto o remodelamento da desmina quanto a ausência de alteração na organização estrutural desses filamentos nas CME que continham cistos. À semelhança da desorganização de desmina indicada por Gomes (2011) em CME após 3-24 h de infecção com *T. gondii*, nossos ensaios evidenciaram a diminuição da proteína em torno dos cistos teciduais e sua concentração na periferia e/ou nas extremidades dos miotubos. Esse autor sugere, a partir da quantificação da desmina por Western blot, que este remodelamento levaria à degradação da proteína e auxiliaria no processo de egresso dos parasitos. Essa argumentação não pode ser extrapolada para o nosso sistema, tendo em vista a necessidade de manutenção do cisto por longos períodos em células funcionalmente ativas. O outro lado da questão foi a evidenciação do remodelamento de desmina somente em miotubos e ausente em miofibras, o que poderia ser justificado pelo fato desta proteína, músculo-específica, ser a última a

ser sintetizada ao longo da miogênese (Costa, 2014). A organização e formação de sarcômeros durante a miogênese requer a participação ativa dos filamentos de desmina, e quanto mais avançada a miofibrinogênese, maior a estabilidade dessas estruturas, o que poderia justificar os resultados descritos no nosso trabalho. Associando essa questão à toxoplasmose, as miopatias observadas durante a infecção congênita reforça a hipótese aqui sugerida e é compatível com a maturação das miofibras ao longo do processo da embriogênese muscular. Considerando-se que a biologia celular do parasito requer seu estabelecimento por longos períodos no interior da célula hospedeira, a ausência de distúrbios nos filamentos de desmina seria altamente vantajosa para ambas as partes. Sabe-se que o comprometimento da estrutura da desmina provoca alterações mitocondriais e a degeneração muscular, levando ao desenvolvimento das miopatias esqueléticas denominadas desminopatias (Schröder e Schoser, 2009; Clemen *et al.*, 2013). Uma investigação mais aprofundada de proteínas acessórias do citoesqueleto, certamente poderia esclarecer essa questão, pois essa rede de filamentos funciona de forma integrada para garantir a funcionalidade do tecido muscular, em particular durante o estabelecimento da toxoplasmose congênita.

Para avaliar os filamentos intermediários na célula Vero, selecionamos o componente mais diversificado e abundante do citoesqueleto das células epiteliais: as citoqueratinas. Os filamentos de citoqueratina são específicos de células epiteliais e nossos resultados apontam diferentes perfis de distribuição destes filamentos durante o estabelecimento da cistogênese de *T. gondii* em células Vero. Observamos a ausência de alterações no arranjo dos filamentos de citoqueratina quando VP contendo taquizoítos foram encontrados. Nossos resultados foram conflitantes com os de Halonen e Weidner (1994), que demonstraram o remanejamento de outro tipo de filamento intermediário (vimentina) para a periferia de VP em células Vero. A variável que difere nossos ensaios desse estudo foi o tempo de infecção e o tipo de filamento avaliado: os filamentos de vimentina foram observados com 24 h enquanto a análise para citoqueratina foi feita a partir de 72 h. Identificamos, no entanto, o remodelamento dos filamentos de citoqueratina ao redor de VP em transição e cistos, e relacionamos o aumento da intensidade da marcação da citoqueratinas, ao curso temporal da cistogênese. Nossos resultados estão de acordo com o único relato da avaliação dos filamentos intermediários em cistos de *T. gondii* encontrados em astrócitos (Halonen *et al.* 1998), os quais descreveram o

acúmulo de filamentos gliais em torno dos cistos. Nós apresentamos dados contundentes do remodelamento dos filamentos de citoqueratina ao redor de VP em transição e de cistos, e sugerimos que este rearranjo esteja envolvido na estabilização física dessas estruturas. Uma das alternativas para testar essa hipótese seria o pré-tratamento de células antes e durante a infecção com cistos já formados por meio de compostos que desestabilizem esses filamentos.

Outro fato que merece destaque é a associação das estruturas císticas com o núcleo da célula hospedeira observado nos nossos ensaios e previamente relatado por Halonen e Weidner (1994) em células Vero. Dada a incapacidade do parasito em sintetizar purinas *de novo* como descrito por Schwartzman e Pfefferkorn (1982), podemos sugerir que essa associação observada também no presente trabalho, permita a obtenção destas moléculas através da interceptação do seu tráfego para o núcleo pelos bradizoítos intracísticos.

O citoesqueleto da CME é composto de muitas proteínas formadoras ou não de filamentos. Essas proteínas têm como objetivo a manutenção da citoarquitetura da miofibra através da estruturação dos sarcômeros e conferem a principal característica do tecido muscular esquelético, a contração muscular. Até o momento, avaliamos as principais proteínas formadoras de filamentos na CME (actina, tubulina e desmina). Contudo, a miosina e a plectina são proteínas acessórias intimamente relacionadas com os filamentos previamente analisados neste trabalho. A miosina está presente no sarcômero, participando ativamente da contração muscular junto com os microfilamentos de actina. Já a plectina, é uma proteína acessória que não forma filamentos, responsável pela organização estrutural dos filamentos de desmina e interligação de sarcômeros adjacentes, organelas e junções celulares na miofibra. Sendo assim, selecionamos estas proteínas acessórias para a nossa análise.

Para a avaliação da miosina em CME mononucleadas e multinucleadas, utilizamos um anticorpo que reconhece ambas as cadeias desta proteína, pesada e leve. Desta forma, não observamos o padrão estriado característico da miofibra. Nossos resultados indicaram que a distribuição da miosina da CME não foi modificada quando estas células albergam cistos de *T. gondii*, independentemente do grau de diferenciação da célula hospedeira. Mesmo na presença de VP e VP em transição, não identificamos alterações na organização da miosina. O anticorpo que utilizamos neste trabalho foi capaz de reconhecer a miosina presente no *T. gondii*,

localizada na maquinaria motora embebida entre a membrana e o complexo membranar interno e que permite a geração de força entre componentes do citoesqueleto e substratos extracelulares, ocasionando o mecanismo de deslizamento (“gliding motility”) do parasito (revisto em de Souza *et al.*, 2010). Acreditamos que a análise da miosina de ambas as cadeias (pesada e leve) não foi a melhor estratégia empregada para avaliar a resposta do citoesqueleto da CME durante a cistogênese de *T. gondii*. Com o emprego de um anticorpo específico para a cadeia pesada da miosina, restringindo a análise à estrutura da miosina II, presente no sarcômero de miotubos/miofibras, eliminaríamos a interferência de outras classes desta molécula. Este tipo de análise foi aplicada por Gomes (2011) que mostrou a completa desorganização das miofibras e perda do seu padrão estriado em CME com 24 h de infecção por *T. gondii* durante o ciclo lítico do parasito. Na presente dissertação, o emprego de culturas de CME já diferenciadas, com miofibras estabelecidas, aliadas ao importante papel da miosina II na contratilidade celular, induz ao aprofundamento desta proteína, como por exemplo, a sua revelação durante a cistogênese de *T. gondii* que deverá agregar novos dados da participação da maquinaria estrutural de CME neste contexto.

A rede formada pelo citoesqueleto é composta de microtúbulos, microfilamentos de actina e filamentos intermediários que cooperam entre si para executar várias tarefas. Essa interação depende de proteínas acessórias que desempenham um papel central na organização e estabilidade dos filamentos, como a plectina. Esta proteína é expressa na CME como múltiplas isoformas que apresentam distribuição diferencial. Como um dos nossos objetivos foi avaliar a importância da plectina na resposta do citoesqueleto da CME à cistogênese de *T. gondii*, não distinguimos suas isoformas. Assim, identificamos pela primeira vez a presença de plectina no interior do parasito, sem a detecção de uma região específica para a localização dessa proteína. Somos os pioneiros em evidenciar a presença desta proteína em *T. gondii*, pois nos bancos de dados como o ToxoDB e o UniProt são disponibilizadas apenas sequências de proteínas putativas (cepas ME-49 e VEG, tipos II e III, respectivamente). No que se refere à análise da plectina na CME durante a diferenciação do parasito, relatamos o rearranjo discreto desta proteína ao redor de VP, VP em transição e cisto localizados em células mononucleadas e miotubos. Baseando-se no conhecimento da importância da plectina para a estrutura e função no músculo, consideramos a reorganização sutil

desta proteína no entorno das estruturas do parasito como meio de estabilização do citoesqueleto da célula hospedeira e das organelas celulares, através dos filamentos de desmina, com a finalidade de manter a viabilidade celular.

A plectina é expressa em diversos tecidos, além do músculo, nos tecidos nervoso e epitelial. Na célula epitelial, a plectina realiza ligações com os filamentos de citoqueratina e outros componentes do citoesqueleto, além de complexos transmembranares e lâmina nuclear (Wiche, 1998). O emprego de células Vero para a avaliação do papel da plectina durante a diferenciação de *T. gondii* é útil e fundamental para revelar a complexidade da dinâmica do citoesqueleto da célula epitelial durante a cistogênese de *T. gondii*, tendo em vista haver um acentuado remodelamento dos filamentos de citoqueratinas em células Vero, contendo cistos.

O conjunto de dados presente nesta dissertação indica a complexidade da relação *T. gondii*-célula hospedeira durante o evento de cistogênese. A análise estrutural das proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas revelou a reorganização de algumas dessas proteínas e aparente ausência de alteração no padrão de distribuição de outras. Estes resultados revelam o quão dinâmico é o processo de estabelecimento dos cistos teciduais nos dois modelos celulares distintos, a CME e a célula epitelial. É necessário investigar se as alterações aqui descritas de algumas proteínas da maquinaria estrutural das células estudadas na presença da infecção é consequência da presença do parasito: (i) atuando na clivagem proteolítica dessas moléculas; (ii) alterando a sua expressão gênica ou ainda, (iii) induzindo alterações conformacionais dessas proteínas ou das estruturas formadas por elas. Naquelas proteínas onde nenhuma alteração pode ser detectada ou mesmo naquelas em que alterações foram observadas, uma investigação mais aprofundada pode revelar se há estímulo ou inibição da síntese dessas proteínas, objetivando suportar fisicamente e metabolicamente a presença do cisto tecidual, estrutura que irá perdurar por longos períodos no interior da célula hospedeira.

VIII. CONCLUSÕES

1. A miogênese na linhagem celular C2C12 é otimizada pela variação da densidade celular e concentração de cálcio, além da adição de insulina ao meio. O emprego dessas manobras experimentais permite o estabelecimento de culturas ricas em miofibras, grau máximo de diferenciação da CME *in vitro*;
2. O impacto da cistogênese de *T. gondii* sobre a organização das proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas, como a miosina e a plectina, difere entre CME - linhagem C2C12 e a célula epitelial - linhagem Vero;
3. O fator que influencia as proteínas β -tubulina e desmina de CME em resposta à formação de cistos de *T. gondii* é o estágio de diferenciação da célula hospedeira. A plectina é reorganizada pela presença do parasito, independentemente do estágio do parasito e da miogênese de CME;
4. O remodelamento evidenciado em β -tubulina e citoqueratina em células Vero, durante a cistogênese, é dependente do estágio de diferenciação do *T. gondii*;
5. Durante a cistogênese de *T. gondii* em células Vero a migração e interação de mitocôndrias e retículo endoplasmático com VP em transição e a parede cística são permanentes o que deve garantir o sucesso da manutenção do parasitismo por meio do trânsito de moléculas entre as duas células;
6. A estratégia de empregar células Vero, como produtoras de cistos de *T. gondii*, em larga escala minimiza o uso de animais experimentais e atende ao princípio dos 3Rs da sustentabilidade.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog. 2005; 1(2): e17.
- Alves-Costa FA, Silva MD, Wasko AP. Characterization of α -actin forms in white and red skeletal muscle types of *Leporinus macrocephalus* (Characiformes, Anostomidae). An Acad Bras Cienc. 2015; 87(4):2055-66.
- Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. Curr Protoc Microbiol. 2008; Appendix-4E.
- Amoasii L, Hnia K, Chicanne G, Brech A, Cowling BS, Müller MM, *et al.* Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle *in vivo*. J Cell Sci. 2013; 126(8):1806-19.
- Andrade EF, Stumbo AC, Monteiro-Lea LH, Carvalho L, Barbosa HS. Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? J Submicrosc Cytol Pathol. 2001; 33(3):337-41.
- Angelis LD, Borghi S, Melchionna R, Berghella L, Baccarani-Contri M, Parise F, *et al.* Inhibition of myogenesis by transforming growth factor beta density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(21):12358-63.
- Ariga M, Nedachi T, Katagiri H, Kanzaki M. Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. J Biol Chem. 2008; 283(15):10208-20.
- Attias M, Vommaro RC, de Souza W. A organização estrutural de *Toxoplasma gondii*. In: de Souza W, Belfort Jr R. Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p. 47-60.
- Azakir BA, Di Fluvio S, Therrien C, Sinnreich M. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. PLoS One. 2010; 5(4):e10122.
- Barbosa HS, Ferreira-Silva MF, Guimarães EV, Carvalho L, Rodrigues RM. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during intranuclear localization. J Parasitol. 2005; 91(1):182-4.
- Barbosa HS, de Munro RM, Moura MA. O ciclo evolutivo. In: de Souza W, Belfort Jr R. Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p.33-45.
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 4(2):a008342.

- Blackman MJ, Carruthers VB. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16(4):459-64.
- Blader IJ, Saeji JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS.* 2009; 117(5-6):458-76.
- Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, *et al.* Plasticity of the differentiated state. *Science.* 1985; 230(4727):758-66.
- Bloemink MJ, Melkani GC, Bernstein SI, Geeves MA. The relay-converter interface influences hydrolysis of ATP by skeletal muscle myosin II. *J Biol Chem.* 2015; 19: jbc.M115.688002.
- Blondel B, Roijen I, Cheneval JP. Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia.* 1970; 27(3):356-8.
- Boothroyd JC, Black M, Bonnefoy S, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID, *et al.* Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997; 352(1359):1347-54.
- Boyer KM, Holfels E, Roizen N, Swisher C, Mack D, Remington J, *et al.* Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(2):564-71.
- Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10(6): 582-7.
- Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, *et al.* *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol.* 2008; 10(4):908-20.
- Burghardt TP, Sun X, Wang Y, Ajtai K. *In vitro* and *in vivo* single myosin step-sizes in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2016; 4.
- Caldas LA, de Souza W, Attias M. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. *Vet Parasitol.* 2010; 167(1):8-18.
- Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 2007; 313(10):2063-76.
- Cepetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 32:113-20.
- Castañón MJ, Walko G, Winter L, Wiche G. Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochem Cell Biol.* 2013; 140(1):33-53.

- Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today*. 1994; 10(8):293-6.
- Charrasse S, Comunale F, Grumbach Y, Poulat F, Blangy A, Gauthier-Rouvière C. RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell*. 2006; 17(2):749-59.
- Chowdhury SR, Muneyuki Y, Takezawa Y, Kino-oka M, Saito A, Sawa Y, *et al*. Growth and differentiation potentials in confluent state of culture of human skeletal muscle myoblasts. *J Biosci Bioeng*. 2010; 109(3):310-3.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002; 18:637-706.
- Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell*. 2002; 1(3):329-40
- Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2013; 125(1):47-75.
- Conejo R, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M. Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF- κ B and downregulation of AP-1 activities. *J Cell Physiol*. 2001; 186(1):82-94.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, *et al*. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000; 321(7254):142-7.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, *et al*. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*. 2006; 125(2):261-74.
- Costa ML. Cytoskeleton and adhesion in myogenesis. *ISRN Developmental Biology*. 2014; ID 713631:15.
- Croken MM, Ma Y, Markillie LM, Taylor RC, Orr G, Weiss LM, *et al*. Distinct strains of *Toxoplasma gondii* feature divergent transcriptomes regardless of developmental stage. *PLoS One*. 2014; 9(11): e111297.
- Curci R, Battistelli M, Burattini S, D'Emilio A, Ferri P, Lattanzi D, *et al*. Surface and inner cell behaviour along skeletal muscle cell *in vitro* differentiation. *Micron*. 2008; 39(7):843-51.
- da Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccola VL. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. *Exp Parasitol*. 2012; 130(4):463-9.

- de Mendonça JS. Princípios gerais de terapêutica. *In:* de Souza W, Belfort Jr R. *Toxoplasmose e Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p.209-14.
- de Muno RM, Moura MA, de Carvalho LC, Seabra SH, Barbosa HS. Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*. *Folia Parasitol*. 2014; 61(2):113-9.
- de Muno RM. *Toxoplasma gondii*-células epiteliais de felinos: novos aspectos do ciclo enteroepitelial *in vitro* [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2015.
- de Oliveira HC. Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da célula muscular esquelética na cistogênese de *Toxoplasma gondii* [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2014.
- de Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. *Sci Med Porto Alegre*. 2010; 20(1):131-43.
- Detrisac CJ, Sens MA, Garvin AJ, Spicer SS, Sens DA. Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin. *Kidney Int*. 1984; 25(2):383-90.
- Di Cristina M, Marocco D, Galizi R, Proietti C, Spaccapelo R, Crisanti A. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into bradyzoites and tissue cyst formation *in vivo*. *Infect Immun*. 2008; 76(8):3491-3501.
- Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool*. 1972; 19(1):155-77.
- Dubey JP. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cysts formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology*. 1997; 115(1):15-20.
- Dubey JP. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradizoytes to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology*. 1998; 116(1):43-50.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2):267-99.
- Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, *et al*. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol*. 2005; 91(5):1082-93.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, de Oliveira LN, Leifer CA, *et al*. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol*. 2008; 157(3-4):299-305.
- Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J Parasitol*. 2009; 39:877-82.

- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden disease and epidemiology. *Parasitology*. 2012; 139(11):1375-424.
- Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell*. 2004; 3(4):992-1003.
- Eng H, Herrenknecht K, Semb H, Starzinski-Powitz A, Ringertz N, Gullberg D. Effects of divalent cations on M-cadherin expression and distribution during primary rat myogenesis *in vitro*. *Differentiation*. 1997; 61(3):169-76.
- Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev Gen*. 2013; 15(1):7-21.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res*. 1987; 73(6):483-91.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(2):133-48.
- Ferreira AM, Vitor RWA. Aspectos taxonômicos e evolutivos. *In: de Souza W, Belfort Jr R. Toxoplasmose e Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p.21-31.
- Ferreira-da-Silva M da F, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*. 2008; 4(8):824-34.
- Ferreira-da-Silva M da F, Takács AC, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int J Med Microbiol*. 2009a; 299(5):381-8.
- Ferreira-da-Silva M da F, Rodrigues RM, Andrade EF, de Carvalho L, Gross U, Lüder CG, *et al*. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009b; 104(2):196-200.
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis – a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90203.
- Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FC. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol*. 2011; 175(1-2):33-9.
- Gomes AF, Guimarães EV, Carvalho L, Correa JR, Mendonça-Lima L, Barbosa HS. *Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis. *BMC Microbiol*. 2011; 11:110-118.

- Gomes AF. *Toxoplasma gondii* - célula muscular esquelética: aspectos estruturais e moleculares nos sistemas *in vitro* e *in vivo* [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
- Gomes AF, Magalhães KG, Rodrigues RM, de Carvalho L, Molinaro R, Bozza PT, et al. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IF- γ and PGE₂. *Parasit Vectors*. 2014; 7:47.
- Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2005; 26(6-8):389-400.
- Grimwood J, Mineo JR, Kasper LH. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect Immun*. 1996; 64(10):4099-104.
- Guimarães EV, Acquarone M, de Carvalho L, Barbosa HS. Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization. *Micron*. 2007; 38(6):651-8.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J Parasitol*. 2008; 94(1):72-83.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(2):170-4.
- Halonen SK, Weidner E. Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol* 1994; 41(1):65-71.
- Halonen SK, Weiss LM, Chiu FC. Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes *in vitro*. *Int J Parasitol*. 1998; 28(5):815-23.
- Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013; 114:125-45.
- Hijikata T, Murakami T, Ishikawa H, Yorifuji H. Plectin tethers desmin intermediate filaments onto subsarcolemmal dense plaques containing dystrophin and vinculin. *Histochem Cell Biol*. 2003; 119(2):109-123.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(10):634-40.
- Hnia K, Tronchère H, Tomczak KK, Amoasii L, Schultz P, Beggs AH, et al. Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2011; 121(1):70-85.
- Hsiao SP, Chen SL. Myogenic regulatory factors regulate M-cadherin expression by targeting its proximal promoter elements. *Biochem J*. 2010; 428(2):223-33.

- Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Rev Microbiol*. 2012; 10(11):766-78.
- Inestrosa SA, Yagil G, Yaffe D. Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation *in vitro*. *Dev Biol*. 1971; 25(1):1-29.
- Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn*. 1994; 199(4):326-37.
- Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 2012; 55(6):845-51.
- Jones TC, Yeh S, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med*. 1972; 136(5):1157-72.
- Kapitein LC, Hoogenraad CC. Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2011; 46(1):9-20.
- Kaspar P, Pajer P, Sedlak D, Tamaoki T, Dvorak M. c-Myb inhibits myogenic differentiation through repression of MyoD. *Exp Cell Res*. 2005; 309(2):419-28.
- Kaufmann U, Martin B, Link D, Witt K, Zeitler R, Reinhard S, *et al*. M-cadherin and its sisters in development of striated muscle. *Cell Tissue Res*. 1999; 96(1):191-8.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes and infection*. 2008; 10(9):978-984.
- Knoll LJ, Boothroyd JC. Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(2):807-14.
- Konigsberg IR, McElvain N, Tootle M, Hermann H. The dissociability of deoxyribonucleic acid synthesis from the development of multinuclearity of muscle cells in culture. *J Biophys Biochem Cytol*. 1960; 8:333-43.
- Konigsberg IR. Clonal analysis of myogenesis. *Science*. 1963; 140:1273-84.
- Konigsberg IR, Sollmann PA, Mixer LO. The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol*. 1978; 63(1):11-26.
- Labesse G, Gelin M, Bessin Y, Lebrun M, Papoin J, Cerdan R, *et al*. ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity. *Structure*. 2009; 17(1):139-46.
- Lavine MD, Arrizabalaga G. Exit from host cells by the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* does not require motility. *Eukaryot Cell*. 2008; 7(1):131-40.
- Lemgruber L, de Souza W, Vommaro RC. Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron*. 2008; 39(2):177-83.

- Lescault PJ, Thompson AB, Patil V, Lirussi D, Burton A, Margarit J, *et al.* Genomic data reveal *Toxoplasma gondii* differentiation mutants are also impaired with respect to switching into a novel extracellular tachyzoite state. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14463.
- Lindon C, Albagli O, Pinset C, Montarras D. Cell density-dependent induction of endogenous myogenin (*myf4*) gene expression *Myf5*. *Dev Biol.* 2001; 240(2):574-84.
- Lindsay DS, Mitschler RR, Toivio-Kinnucan MA, Upton SJ, Dubey JP, Blagburn BL. Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Am J Vet Res.* 1993; 54(10):1663-7.
- Linkhart TA, Clegg CH, Hauschka SD. Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev Biol.* 1981; 86(1):19-30.
- Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 2015; 8:292.
- Lopes CS, Franco PS, Silva NM, Silva DA, Ferro EA, Pena HF, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. *Epidemiol Infect.* 2016; 8:1-11.
- Lüder CG, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol.* 1999; 93(1): 23-32.
- Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centers: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(2):161-7.
- Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech.* 2005; 67(1):45-52.
- Mège RM, Goudou D, Diaz C, Nicolet M, Garcia L, Geraud G, *et al.* N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localization and effect of blockade by peptides and antibodies. *J Cell Sci.* 1992; 103(4):897-906.
- Melo EJ, Carvalho TM, de Souza W. Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell* 2001; 25(1):53-9.
- Melzer TC, Cranston HJ, Weiss LM, Halonen SK. Host cell preference of *Toxoplasma gondii* cysts in murine brain: a confocal study. *J Neuroparasitology.* 2010; 1. pii: N100505.
- Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiol.* 2008; 10(5):1153-65.
- Moresi V, Marroncelli N, Adamo S. New insights into the epigenetic control of satellite cells. *World Stem Cells.* 2015; 7(6):945-55.

Moura M de A, Amendoeira MR, Barbosa HS. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(6):862-64.

Musumeci G, Castrogiovanni P, Coleman R, Szychlinska MA, Salvatorelli L, Parenti R, *et al.* Somitogenesis: from somite to skeletal muscle. Acta Histochem. 2015; 117(4-5):313-28.

Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. C R Acad Sci. 1908; 147:763-66.

Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. C. R. Acad Sci. 1909; 148:369-72.

Nolan SJ, Romano JD, Luechtefeld T, Coppens I. *Neospora caninum* recruits host cell structures to its parasitophorous vacuole and salvages lipids from organelles. Eukaryot Cell. 2015; 14(5):454-73.

Odell AV, Tran F, Foderaro JE, Poupart S, Pathak R, Westwood NJ, *et al.* Yeast three-hybrid screen identifies TgBRADIN/GRA24 as a negative regulator of *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. PLoS One. 2015; 10(3):e0120331.

Orozco-García E, Trujillo-Correa A, Gallego-Gómez, JC. Cell biology of virus infection: the role of cytoskeletal dynamics integrity in the effectiveness of dengue virus infection. *In*: Najman S. Cell biology – new insights. InTech; 2016. ISBN 978-953-51-2242-5.

Paredes-Santos TC, de Souza W, Attias M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. J Struct Biol. 2012; 177(2):420-30.

Parades-Santos TC, Martins-Duarte ES, Vitor RW, de Souza W, Attias M, Vommaro RC. Spontaneous cystogenesis *in vitro* of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Int. 2013; 62(2):181-8.

Paredes-Santos, TC. Estudo morfológico da cistogênese do *Toxoplasma gondii* e sua interação com a célula hospedeira [tese]. Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2015.

Pastuszak M, Groszewski K, Pastuszak M, Dyrła P, Wojtuń S, Gil J. Cytokeratins in gastroenterology. Systematic review. Prz Gastroenterol. 2015; 10(2):61-70.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol. 2008; 38(5):561-569.

Pernas L, Boothroyd JC. Association of host mitochondria with the parasitophorous vacuole during *Toxoplasma* infection is not dependent on rhoptry proteins ROP2/8. Int J Parasitol. 2010; 40(12):1367-71.

Pernas L, Adomako-Ankomah Y, Shastri AJ, Ewald SE, Treeck M, Boyle JP, *et al.* *Toxoplasma* effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. PLoS Biol. 2014; 12(4):e1001845.

- Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. BMC Biol. 2005; 3:26.
- Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome M., Behnke MS, Liberator P, *et al.* Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. PLoS Pathog. 2006; 2(10):e105.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(2):264-96.
- Roiko MS, Carruthers VB. Functional dissection of *Toxoplasma gondii* perforin-like protein 1 reveals a dual domain mode of membrane binding for cytolysis and parasite egress. J Biol Chem. 2013; 288(12):8712-25.
- Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in Vero cell line. Trop Biomed. 2010; 27(1):125-30.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. Scand J Infect Dis. 2012; 44(11):805-14.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. Trends Parasitol. 2005; 21(10):476-81.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. Int J Med Microbiol. 2014; 304(7):917-29.
- Schröder R, Schoser B. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. Brain Pathol. 2009; 19(3):483-92.
- Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(2):509-13.
- Schwartzman JD, Pfefferkorn ER. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. Exp Parasitol. 1982; 53(1):77-86.
- Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ, *et al.* Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. Traffic. 2005; 6(12):1125-41.
- Sethi KK, Rahman A, Pelster B, Brandis H. Search for the presence of lectin-binding sites on *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1977; 63(6):1076-80.
- Shainberg A, Yagil G, Yaffe D. Control of myogenesis *in vitro* by Ca⁺⁺ concentration in nutritional medium. Exp Cell Res. 1969; 58(1):163-7.
- Shen B, Sibley LD. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. Curr Opin Microbiol. 2012; 15(4):449-55.

- Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.* 1997; 110(17):2117-28.
- Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 2001; 154(1):95-108.
- Sinai AP. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem.* 2008;47:155-64.
- Singh U, Brewer JL, Boothroyd JC. Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differentiation mutants in *Toxoplasma gondii* reveals a hierarchy of gene induction. *Mol Microbiol.* 2002; 44(3):721-33.
- Sivrikaya G, Bağrıaçık EÜ. Production of *Toxoplasma gondii* in Vero cell culture. *Turkiye Parazitol Derg.* 2011; 35(2):61-4.
- Soète M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp Parasitol.* 1993; 76(3):259-64.
- Soète M, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 219:76-80.
- Speer CA, Dubey, JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):193-206.
- Splendore A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci São Paulo.* 1908; 3:109-12.
- Splendore A. Sopra um nuovo protozoo parassita dei conigli. *Rev Soc Sci São Paulo.* 1909; 4:75-9.
- Swierzy IJ, Muhammad M, Kroll J, Abelmann A, Tenter A, Lüder CGK. *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-born parasite transmission. *In J for Parasitol.* 2013; 44(2):91-8.
- Swierzy IJ, Lüder CG. Withdrawal of skeletal muscle cells from cell muscle progression triggers differentiation of *Toxoplasma gondii* towards the bradyzoite stage. *Cell Microbiol.* 2015; 17(1):2-17.
- Takács AC, Swierzy IJ, Lüder CGK. Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immune immunity-related GTPases. *PLoS One.* 2012; 7(9):e45440.
- Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, *et al.* Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. *Muscle Nerve.* 2011; 44(6):968-77.

- Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(2):364-69.
- Torres CM. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caractérisée par la présence d'une parasite intracellulaire, très proche de *Toxoplasma* et de l'Encephalitozoon, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire sous-cutané et le tissu nerveux. C R Soc Biol. 1927; 97:1778-81.
- Vommaro RC, Attias M, de Souza W. A interação de *Toxoplasma gondii* com a célula hospedeira. In: de Souza W, Belfort Jr R. *Toxoplasmose e Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p.69-81.
- Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci. 2014; 71(7):1245-63.
- Walker ME, Hjort EE, Smith SS, Tripathi A, Hornick JE, Hinchcliffe EH, et al. *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. Microbes Infect. 2008; 10(14-15):1440-9.
- Webster JP, Kaushik M, Bristow GC, McConkey GA. *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? J Exp Biol. 2013; 216(1):99–112.
- Weilhammer DR, Iavarone AT, Villegas EN, Brooks GA, Sinai AP, Sha WC. Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2012; 42(10):947-59.
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Front Biosci. 2000; 5:391-405.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009; 39(8):895-901.
- Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. J Cell Sci. 1998; 111(14):2477-86.
- Wiche G, Winter L. Plectin isoforms as organizers of intermediate filament cytoarchitecture. Bioarchitecture. 2011; 1(1):14-20.
- Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube RE. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. J Cell Biol. 2011; 194(5):669-78.
- Winter L, Wiche G. The many faces of plectin and plectinopathies: pathology and mechanisms. Acta Neuropathol. 2013; 125(1):77-93.
- Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. Bull Neurol Inst NY. 1937; 6:306-71.

- Yaffe D. Rat skeletal muscle cells. *In*: Kruse Jr PF, Patterson Jr MK. Tissue culture: methods and applications. New York: Ac Press; 1973. p.106-14.
- Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977; 270(5639):725-7.
- Yasumura Y, Kawakita M. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*. 1963; 21(6):1201-19.
- Yolken RH, Dickerson FB, Fuller Torrey E. Toxoplasma and schizophrenia. *Parasite Immunol*. 2009; 31:706-15.
- Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, *et al*. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Kisaengchunghak Chapchi*. 1991; 29(2):121-8.
- Zhang M, Joyce BR, Sullivan WJ Jr, Nussenzweig V. Translational control in *Plasmodium* and *Toxoplasma* parasites. *Eukaryotic Cell*. 2013; 12(2):161-7.
- Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Wittner M, Weiss LM. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun*. 2001; 69(1):501-7.