

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Participação da autofagia na interação *Toxoplasma gondii*-célula  
hospedeira**

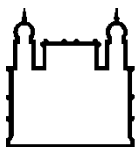
por

Xênia Macedo Souto

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

**Orientadores:** Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto  
Dra. Helene Santos Barbosa

**RIO DE JANEIRO**  
**Setembro, 2013**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***XÊNIA MACEDO SOUTO***

**PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA INTERAÇÃO *Toxoplasma gondii*-CÉLULA  
HOSPEDEIRA**

**ORIENTADORES: Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto  
Dra. Helene Santos Barbosa**

**Aprovada em: 24 / 09 / 2013**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro (IOC/Fiocruz) - Presidente**

**Prof. Dra. Rossiane Claudia Vommaro (IBCCF/UFRJ)**

**Prof. Dra. Lais de Carvalho (IBRAG/UERJ)**

**Prof. Dra. Solange Lisboa de Castro (IOC/Fiocruz) – Revisora/ suplente**

**Prof. Dr. Erick Vaz Guimarães (IOC/Fiocruz) suplente**

**Dedico esta dissertação  
aos meus pais, Elite e Alcimar  
exemplos de vida para mim e sem  
os quais nada disso seria possível.  
Obrigada por todo amor e paciência.**

## **AGRADECIMENTOS**

Foi Deus quem me deu a base e a oportunidade de estar aqui, a força para executar um desejo que foi Dele e a alegria de finalizá-lo. Não poderia começar essa página agradecendo senão a Ele por cada passo dado, por cada vitória alcançada e pela força na superação de cada obstáculo. Obrigada por ser o meu princípio, o meu meio e o meu fim em tudo em minha vida!

Agradeço a toda a minha família pelo apoio na concretização de mais esse sonho, em especial aos meus pais, Elite Vânia e José Alcimar, as pessoas que mais amo nessa vida, por sempre desejarem muito mais para mim do que eles tiveram a oportunidade de ter. Eles que abriram mão de me ver crescer fisicamente, desde os 15 anos, para me ver crescer profissionalmente. Obrigada por me ensinarem a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir deles!

Aos meus orientadores os Drs. Rubem Menna-Barreto e Helene Santos Barbosa pela confiança em mim depositada, por toda a ajuda, pela paciência, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelos “puxões de orelha” e, acima de tudo, por terem sobrevivido a mim (rsrsrs)! Cada um, da sua maneira, me ensinou muito do início ao fim! E sem dúvida, se não termino essa etapa a mesma que a iniciou, devo muito disso aos dois. O meu eterno obrigada!

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Estrutural que me acolheu de braços abertos.

À Sandra (Sandroka), a quem “amo de paixão”, por toda a ajuda, apoio, amizade e carinho concedido a mim ao longo desses dois anos! O que seria de mim nesse LBE sem você (S2)? Simplesmente fundamental para a realização desse trabalho!

À Vivi, à Thaís, à Jaqueline, à Rafinha, à Luciany, ao Antônio, ao Walter, ao Rafael, ao Henrique, e à Renata por toda a ajuda e pelos momentos de descontração! Na alegria ou na tristeza, foi muito bom trabalhar com vocês!

Ao Dr. Erick Vaz Guimarães pela disponibilidade e ajuda nos momentos em que precisei.

À equipe da esterilização, em especial ao Amaro pela paciência, disponibilidade e pelo sorriso sempre estampado no rosto! À Priscila por todo o suporte e por me “aturar” nas horas vagas!

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular, chefiado pela Dra Maria Nazaré Soeiro, minha segunda casa, e onde tudo começou.

Ao povo da sala 70: Mich, Marcelle, Thabata, Ana Cristina, Natália e Ana Helisa, por toda a amizade, carinho, apoio e risadas ao longo deste tempo! Ainda que eu estivesse distante, vocês nunca deixaram de estar comigo! (S2)

Mich e Marcelle, não tenho palavras para vocês! Nossas conversas já consumiram todas elas (S2)! Só posso dizer que Amo muito!

Thabata, muito obrigada por toda a ajuda e disponibilidade desde o início! “Entre tapas e beijos”, nós nos entendemos!

Ana, obrigada por dar corda às minhas loucuras! Adoro você!

À galera da toxinologia por toda a ajuda! Vivi, “agora eu fiquei doce!” (S2).

À Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, tão necessária para a conclusão deste trabalho.

Às minhas eternas amigas de Viçosa e Juiz de Fora: Martinha (Xuxu, “amo forever”), Andreia, Alininha e Cris. Amo cada uma de vocês! Obrigada pela força para chegar até aqui e por cada momento indescritível que passamos juntas!

A todo o MUR Viçosa, em especial ao Mau Mau, Gi, Kamilla Rodrigues e Angel, por todo carinho.

Ao Acampamento Maanaim e à Comunidade Shalom (em especial ao grupo Ágape) por cada experiência vivida e por ter me dado forças para alcançar mais essa vitória!

Ao Sion pela acolhida, desde o início, em especial às Sionzetas por cada momento vivido! Foi muito bom conviver com vocês!

Aos amigos de Niterói e Petrópolis: Rachel, Luciana e Fabrício. Muito obrigada por todo carinho! (S2)

À Marcela das Chagas (MUR Niterói) e à Thaís Lugon (Comunidade Shalom) pela amizade e por terem me apresentado o Rio de Janeiro naquilo que mais amo! Obrigada por tudo!

À Dra. Solange Lisboa de Castro pela revisão dessa dissertação.

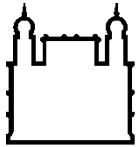
À Banca Examinadora pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com esse trabalho.

Ao CNPq, FAPERJ e FIOCRUZ pelo suporte financeiro.

**“Ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.” (1 Coríntios 13:2)**

**“Bote fé,  
Bote esperança,  
Bote amor!”**

**(Papa Francisco – JMJ RIO 2013)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

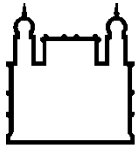
### PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA INTERAÇÃO *Toxoplasma gondii*-CÉLULA HOSPEDEIRA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Xênia Macedo Souto**

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório, agente causador da toxoplasmose, uma das zoonoses mais difundidas no mundo, podendo ser transmitido por via transplacentária, fecal-oral ou por carnivorismo. Durante a resposta imune do hospedeiro, ocorre a formação de cistos teciduais, possibilitando assim a manutenção do parasito no interior da célula hospedeira, sem ocorrência da fusão fagolisossomal. A autofagia, processo de degradação de componentes celulares, é crucial para a homeostase celular. Recentemente, vem sendo proposta a participação da via autofágica na interação de diferentes patógenos, como o *T. gondii*, com suas células hospedeiras. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel da via autofágica na interação de *T. gondii* com macrófagos e células musculares esqueléticas (CME e C2C12), células envolvidas na infecção natural *in vivo*. A autofagia nas células hospedeiras foi avaliada na presença ou na ausência de indutores autofágicos (rapamicina ou estresse nutricional), durante a infecção pelo *T. gondii*. Ambos os estímulos foram capazes de inibir a infecção e a proliferação intracelular do parasito nos diferentes tipos celulares. Foi observado ainda que a infecção na presença ou na ausência de estímulo induziu a autofagia em macrófagos e CME, indicando que este processo possa regular naturalmente a manutenção intracelular do parasito, auxiliando-o, por exemplo, na captação de nutrientes da célula hospedeira. Adicionalmente, os aspectos morfológicos das culturas de macrófagos e CME infectadas tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional sugerem a eliminação do *T. gondii* por mecanismos que envolvem tanto a autofagia da célula hospedeira quanto a do parasito. Dessa forma, os resultados do presente trabalho sugerem a indução da autofagia da célula hospedeira como um mecanismo regulador importante durante a infecção, representando, no entanto, a sua exacerbação, uma via de eliminação desse parasito. Além disso, os nossos resultados encorajam a utilização da rapamicina como modelo para o estudo da autofagia *in vivo* durante a infecção aguda pelo *T. gondii*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA INTERAÇÃO *Toxoplasma gondii*-CÉLULA HOSPEDEIRA

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Xênia Macedo Souto**

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite, the causative agent of toxoplasmosis, one of the most widespread zoonoses in the world and can be transmitted by transplacental, fecal-oral or carnivorous routes. During the host immune response, there is the formation of tissue cysts, thus enabling the maintenance of parasite within the host cell without occurrence of phagolysosomal fusion. Autophagy, the degradation process of cellular components, is critical for cellular homeostasis. Recently, the autophagy has been proposed to participate during the interaction between different pathogens, such as *T. gondii*, with their host cell. Thus, the present study aimed to evaluate the role of the autophagic pathway in the interaction of *T. gondii* with macrophages and skeletal muscle cells (C2C12 and CME), cells involved in natural infection *in vivo*. Host cells autophagy was assessed in the presence or absence of autophagic inducers (rapamycin or nutritional stress) during the infection with *T. gondii*. Both stimuli were able to inhibit infection and proliferation of the intracellular parasite in different cell types. It was also observed that the infection in the presence or absence of stimulation induced autophagy in macrophages and CME, indicating that this process may naturally regulate the maintenance of intracellular parasites, assisting him, for example, in the nutrients uptake from the host cell. Additionally, the morphological aspects of cultures of infected macrophages and CME treated with rapamycin or subjected to nutritional stress suggest the elimination of *T. gondii* by mechanisms involving both, host cell and parasite autophagy. Thus, the present results suggest the induction of host cell autophagy as an important regulatory mechanism during the infection, however its exacerbation can represent one route of parasite elimination. Furthermore, our results encourage the use of rapamycin as a model for *in vivo* autophagic studies during acute infection of *T. gondii*.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CDC** - Centro para o controle e prevenção de doenças, do inglês “Center for Disease Control and Prevention”

**SNC** - Sistema nervoso central

**AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês “Acquired immunodeficiency syndrome”

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana, do inglês “Human immunodeficiency virus”

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

**LC3** - Proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia pesada 3, do inglês “microtubule-associated protein 1 light chain 3”

**mTOR** - Alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês “Mammalian target of rapamycin”

**ULK1** - Serina/treonina proteína quinase 1, do inglês “Serine/threonine-protein kinase”

**PI3K** - Fosfatidilinositol 3-quinase, do inglês “Phosphatidylinositide 3-kinases”

**Vps34** - Proteína associada ao endereçamento vacuolar, do inglês “Vacuolar protein sorting-associated protein”

**AMC** - Autofagia mediada por chaperona

**LAMP** - Proteína associada à membrana lisossomal, do inglês “Lysosome-associated membrane protein”

**INF- $\gamma$**  - Interferon gama, do inglês “Interferon-gamma”

**CD** - Grupo de diferenciação, do inglês “Cluster of Differentiation”

**IGTP** - Guanosina trifosfatase induzida, do inglês “Inducibly expressed guanosine triphosphatase”.

**TNF** - Fator de necrose tumoral, do inglês “Tumor necrosis factors”

**CME** - Células musculares esqueléticas

**PBS** – Salina tamponada com fosfato, do inglês “Phosphate buffered saline”

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

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”

**SFB** - Soro fetal bovino

**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”

**PFA** - Paraformaldeído

**BSA** - Albumina sérica bovina, do inglês “Bovine Serum Albumin”

**DMEM/-** - DMEM sem glicose e sem suplementação de SFB.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Toxoplasmose.....	2
1.1.1. <i>Transmissão</i> .....	3
1.1.2. <i>Epidemiologia</i> .....	4
1.1.3. <i>Manifestações clínicas</i> .....	5
1.1.4. <i>Tratamento</i> .....	7
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	8
1.2.1. <i>Taxonomia e ciclo biológico</i> .....	8
1.2.2. <i>Morfologia</i> .....	11
1.2.3. <i>Interação T. gondii-célula hospedeira</i> .....	15
1.3. <i>Autofagia</i> .....	16
1.3.1. <i>Mecanismos</i> .....	18
1.3.2. <i>Participação na interação parasito-célula hospedeira</i> .....	22
2. OBJETIVOS .....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4. RESULTADOS .....	33
5. DISCUSSÃO .....	93
6. CONCLUSÕES .....	102
7. REFERÊNCIAS.....	104
8. ANEXO.....	120

# **1.INTRODUÇÃO**

## 1.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de ocorrência mundial muito frequente em várias espécies de mamíferos e aves, inclusive o ser humano, causada pelo protozoário parasito intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*. O *T. gondii* apresenta-se em três estágios infectantes que determinam diferentes formas de transmissão desta doença: os taquizoítos (do grego “tachos” = rapidez) de divisão rápida, os bradizoítos (do grego “bradi” = lento) de divisão lenta, constituindo os cistos teciduais e os esporozoítos, um estágio ambiental do parasito residente no interior de oocistos (Dubey et al., 1998).

A toxoplasmose pode ser caracterizada basicamente em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, predominam taquizoítos, responsáveis pela infecção de um grande número de células e pela expansão da infecção devida à sua rápida multiplicação acarretando a lise da célula hospedeira e a reinfecção de novas células. Nesta fase, as manifestações clínicas da doença dependem da imunidade do paciente. Indivíduos imunocompetentes raramente apresentam sintomatologia. Entretanto, pacientes imunocomprometidos e crianças com a forma congênita da toxoplasmose desenvolvem formas graves da doença (Luft et al., 1984). Por outro lado, a fase crônica é caracterizada pela formação de cistos teciduais do *T. gondii* resultantes da conversão de taquizoítos para bradizoítos em decorrência de uma resposta imune eficaz contra o parasito. Esses cistos se alojam principalmente no cérebro, na retina e nos músculos cardíaco e esquelético, podendo permanecer em estágio latente por anos, sendo que em situações de imunossupressão pode ocorrer a reativação da doença (reagudização) (Dubey et al., 1998).

Historicamente, o *T. gondii* foi descrito simultaneamente em 1908, por Charles Nicolle na Tunísia (África) ao analisar tecidos de um roedor (*Ctenodactylus gundi*), e por Splendore ao analisar tecidos de coelhos no Brasil (Nicolle & Manceaux, 1909; Dubey, 2008). Em 1923, foram relatadas as primeiras implicações deste protozoário em infecções humanas com a ocorrência de cistos oculares em um bebê com hidrocefalia e cegueira (Janku, 1923). Quatro anos mais tarde, foi descrita a presença do parasito em cortes histológicos de cérebro, de musculaturas cardíaca e esquelética durante a necropsia de um recém-nascido (Torres, 1927), sugerindo a existência da transmissão congênita, hipótese comprovada em 1937 (Wolf & Cowen, 1937). Alguns anos depois, casos de toxoplasmose aguda em adultos também foram descritos (Pinkerton & Weinman, 1940; Pinkerton & Henderson, 1941).

Estudos pioneiros a respeito da proteção contra o *T. gondii* realizados por Sabin e colaboradores na década de 40 já relatavam a complexidade da resposta imune tanto inata quanto específica. Anticorpos humorais foram descritos como sendo capazes de eliminar taquizoítos extracelulares, mas não intracelulares (Sabin & Olitsky, 1937; Sabin & Feldman, 1948). A partir da década de 60, vários trabalhos mostraram que a defesa do hospedeiro contra o parasito é mediada pelas células linfóides do sistema imune (Frenkel, 1973; Gazzinelli et al. 1991). O sequenciamento do genoma do *T. gondii* (Kan et al., 2005) aliado aos estudos do seu proteoma, têm estimulado a busca por novos antígenos do parasito tanto para o diagnóstico quanto para a proteção específica (Che et al., 2011; Fritz et al., 2012). No entanto, até hoje não se sabe por que alguns indivíduos desenvolvem a toxoplasmose clínica enquanto outros permanecem assintomáticos.

### **1.1.1. Transmissão**

Dentre as vias de transmissão da toxoplasmose, destacam-se as vias oral, zoonótica e congênita, sendo a infecção transfusional e casos de transplante de órgãos menos recorrentes (Tenter et al., 2000; Jones & Dubey, 2012; Robert-Gangneux & Dardé, 2012). A transmissão por alimentos ocorre, principalmente, pela ingestão de carne crua ou mal passada, proveniente de animais como porco, cordeiro, veado, além de aves, contaminada com cistos do *T. gondii*. O consumo de legumes e frutas não lavados também pode constituir fonte de transmissão do parasito devido à possibilidade de contato destes alimentos com água e solo contaminados com oocistos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Atualmente é estimado que 50% dos novos casos nos Estados Unidos sejam por transmissão alimentar (Scallan et al., 2011; Bayarri et al., 2012).

Por outro lado, o gato apresenta um importante papel na transmissão zoonótica (do animal para o homem) da toxoplasmose. Hospedeiros definitivos do *T. gondii*, os felídeos podem eliminar milhões de oocistos em suas fezes até três semanas após sua infecção. Estes contaminam o ambiente (água, solo e alimentos) e outros animais como roedores e pássaros que se integram à cadeia alimentar e amplificam, ainda mais, as vias de transmissão do parasito (Teutsch et al., 1979; Dubey et al., 2011).

Entretanto, a forma mais grave de transmissão da toxoplasmose é a congênita, determinada pela via transplacentária através da infecção por taquizoítos provenientes da mãe na fase aguda da doença ou pela reagudização da infecção crônica durante a gravidez (Guerina et al., 1994). No entanto, é interessante ressaltar que as mulheres que apresentam sorologia positiva antes da gravidez apresentam menores chances de infectar seus fetos do que aquelas que se infectam durante a gestação. Todavia, a infecção de mulheres pouco antes da concepção (até três meses) também representa importante risco para a criança (Vogel et al., 1996; Gavinet et al., 1997).

### **1.1.2. Epidemiologia**

Estima-se que aproximadamente 25 a 30% da população humana mundial estejam infectadas com o *T. gondii* (Montoya & Liesenfeld, 2004), sendo a prevalência da doença bastante variável entre os países, chegando a alcançar incidência de mais de 95% em algumas regiões (*Center for Disease Control and Prevention - CDC*, 2013). Embora a toxoplasmose tenha distribuição mundial, as infecções são particularmente comuns em climas quentes e úmidos e em altitudes mais baixas. Esta doença apresenta alta soroprevalência em países latinoamericanos e africanos de clima tropical, moderada em países do centro e sul da Europa (30 a 50%) e baixa em países norte-americanos, do sudeste asiático, do norte europeu e em países da região do Sahel na África (10 a 30%) (CDC, 2013; Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

Fatores antropogênicos como hábitos alimentares, sociais, econômicos e culturais, além da qualidade da água e saneamento básico, explicam a variação da soroprevalência em humanos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Alguns autores ainda têm encontrado uma maior prevalência da doença em áreas rurais em relação às urbanas (Sanchez et al., 1994). A depender do contexto regional e/ou socioeconômico envolvido, tem sido observada uma correlação entre infecção e idade. Na infância, em populações vivendo sob condições de pouca higiene, a soroprevalência pode chegar a quase 100%, principalmente devido à ingestão de oocistos provenientes de água e solo contaminados (Bahia-Oliveira et al., 2003; Jones & Dubey, 2010). No Brasil, um estudo mostrou que a soroprevalência em indivíduos de mais baixo nível socioeconômico foi 84%, enquanto naqueles de níveis

médio e maior foi 62% e 23%, respectivamente. Esse trabalho mostrou ainda que cerca de 84% da população de mais baixo nível socioeconômico foi infectada na idade aproximada de 15 anos, enquanto naquela de maior nível socioeconômico, 70% dos casos de infecção ocorreram apenas após os 40 anos (Bahia-Oliveira et al., 2003).

Nos Estados Unidos, mais de 60 milhões de homens, mulheres e crianças encontram-se infectadas com o *T. gondii*, sendo a toxoplasmose considerada uma das principais causas de morte atribuída a doenças transmitidas por alimentos (CDC, 2013). A soroprevalência norte-americana tem-se mostrada maior entre indivíduos negros não hispânicos e mexicanos do que entre indivíduos brancos não hispânicos (Jones et al., 2007). No entanto, de uma forma geral se observa uma diminuição da soroprevalência nas últimas décadas em muitos países industrializados em decorrência, principalmente, do aumento dos níveis socioeconômicos associado à melhoria das condições de higiene (Jones et al., 2007; Villena, 2010; Hofhuis, 2011).

### **1.1.3. Manifestações clínicas**

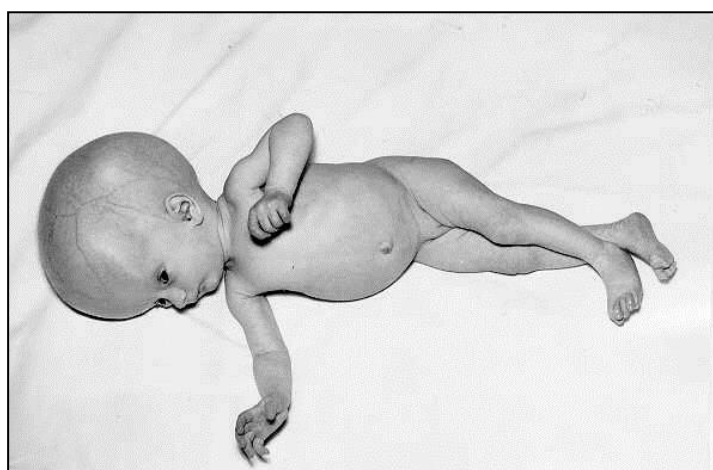
A toxoplasmose humana pode ser dividida em quatro formas clínicas: a adquirida em indivíduos imunocompetentes, a ocular, a congênita e a adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos (Amato Neto et al., 1995; Remington et al., 1995). A infecção primária pelo *T. gondii* em crianças e adultos, incluindo mulheres grávidas, é geralmente assintomática.

A toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes, de curso benigno e auto-limitado, pode se apresentar assintomática ou oligossintomática, sendo os sintomas mais recorrentes a dor de garganta, mialgia, mal-estar, cefaleia e astenia. Esses sintomas são comuns a inúmeras doenças, o que dificulta o diagnóstico preciso (Amato Neto et al., 1995; Remington et al., 1995). Entretanto, a manifestação clínica mais comum é a linfadenopatia cervical ou occipital, que juntamente com a astenia podem persistir por várias semanas, mimetizando a mononucleose infecciosa. Menos frequentemente, miocardite, polimiosite, pneumonite, hepatite ou encefalite podem surgir em indivíduos imunocompetentes (Montoya & Lisenfeld, 2004).



A toxoplasmose ocular pode ocorrer no contexto da doença congênita ou adquirida pós-nascimento como resultado da infecção aguda ou da reativação (Montoya & Remington, 1996; Holland, 1999). Em indivíduos com toxoplasmose aguda adquirida, a coriorretinite pode surgir esporadicamente (Burnett et al., 1998), sendo as lesões brancas focais com intensa reação inflamatória vítrea, sua principal característica. Em adultos, a coriorretinite tem sido considerada uma manifestação tardia decorrente da reativação da toxoplasmose congênita, podendo também surgir em associação com a infecção aguda (Montoya & Remington, 2008).

A toxoplasmose congênita é a forma mais grave da doença em humanos. A infecção aguda numa gestante, principalmente no primeiro trimestre da gestação, pode provocar aborto e graves lesões neurológicas no feto (Gross, 2004). Os fetos acometidos podem apresentar morfologia normal durante os exames prenatais. Entretanto, em alguns casos podem apresentar dilatação ventricular, calcificações intracranianas e hepatomegalia (Gay-Andrieu et al., 2003). As manifestações da toxoplasmose congênita variam bastante podendo incluir hidrocefalia (**Figura. 1.1**), microcefalia, coriorretinite, estrabismo, retardo psicomotor ou mental, petéquias devido à trombocitopenia e anemia (McAuley et al., 1994). No entanto, nenhuma das características descritas nos recém-nascidos com toxoplasmose congênita é característica para essa doença (Montoya & Liesenfeld, 2004).



**Figura 1.1.** Hidrocefalia por toxoplasmose congênita (Dubey & Beattie, 1988).

A toxoplasmose em indivíduos imunodeprimidos, ao contrário do que tem sido observado na maioria dos imunocompetentes, pode ser mortal, como resultado da reativação da infecção crônica (Liesenfeld, 1999), afetando mais tipicamente o

sistema nervoso central (SNC). Em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a toxoplasmose é causada pela recrudescência dos cistos latentes, gerando lesões no SNC. Nos Estados Unidos estima-se que durante a epidemia de AIDS cerca de 40.000 pacientes HIV positivos apresentaram formas clínicas da toxoplasmose, sendo a encefalite a lesão do SNC mais frequente em pacientes, levando ao óbito na ausência de tratamento (Gellin & Soave, 1992). Dentre as manifestações clínicas observadas podem ser citadas convulsões, alterações do estado mental, déficits motores focais, alterações sensoriais, sinais cerebelares e distúrbios de movimento (Montoya & Lisenfeld, 2004). Apesar do acesso livre ao tratamento antirretroviral altamente ativo, a toxoplasmose cerebral em pacientes HIV positivos ainda é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade no Brasil (Mesquita et al., 2010)

Em transplantados, a imunossupressão pode também promover a reativação da infecção pelo *T. gondii*, além da possibilidade de infecção primária a partir dos órgãos recebidos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

#### **1.1.4. Tratamento**

Desde as décadas de 1940 e 1950, o tratamento da toxoplasmose baseia-se nos inibidores da síntese de ácidos nucleicos, sulfonamida e pirimetamina (Koskiniemi et al., 1989). O efeito terapêutico das sulfonamidas foi primeiro descrito em 1941 e sua combinação com sulfadiazina e pirimetamina foi reportada poucos anos depois (Sabin & Warren, 1941; Eyles & Coleman, 1953). Essas drogas associadas ao antibiótico macrolídeo espiramicina, também foram eficazes contra o *T. gondii* (Beverly, 1958), e têm sido a base do tratamento das toxoplasmoses congênita e ocular. No entanto, embora ativos sobre taquizoítos, apresentam baixa eficácia na eliminação dos cistos teciduais latentes que se instalam tanto em humanos quanto em animais, mantendo-se estes viáveis por anos e capazes de reativar a infecção (Beaman et al, 1992; Winstanley, 1995). Nesse contexto, não existe ainda um medicamento eficiente para as fases aguda e crônica da toxoplasmose. Desta forma, considerando-se a toxicidade e os efeitos colaterais dos medicamentos disponíveis, recomenda-se o tratamento apenas dos casos agudos da toxoplasmose ocular e dos indivíduos imunodeficientes (Kappagoda et al., 2011).

A associação de drogas mais utilizada na terapêutica tanto da toxoplasmose ocular quanto da encefalite em pacientes HIV positivos é pirimetamina e sulfadiazina. Ambos os compostos impedem a síntese de ácidos nucleicos e, conseqüentemente, a proliferação do *T. gondii*. Dentre os vários efeitos colaterais destacam-se dores abdominais, erupções cutâneas e dores de cabeça. Alternativamente, a associação da trimetoprima com o sulfametoxazol tem mostrando eficácia similar (Torre et al., 1998; Soheilian et al., 2005).

Nos Estados Unidos, a espiramicina é geralmente recomendada para o tratamento da toxoplasmose adquirida durante a gravidez visando reduzir o risco da transmissão do parasito e o desenvolvimento da forma congênita, embora haja controvérsias com relação a sua eficácia (Thiebaut et al, 2007; Montoya & Remington, 2008). A associação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico é recomendada geralmente em casos de infecção em gestantes com 18 semanas ou mais de gravidez ou de transmissão congênita já confirmada. Após o parto, os recém-natos com infecção congênita são ainda tratados por 12 meses com a mesma associação. Já indivíduos imunocompetentes com toxoplasmose aguda geralmente não requerem tratamento (Kappagoda et al., 2011).

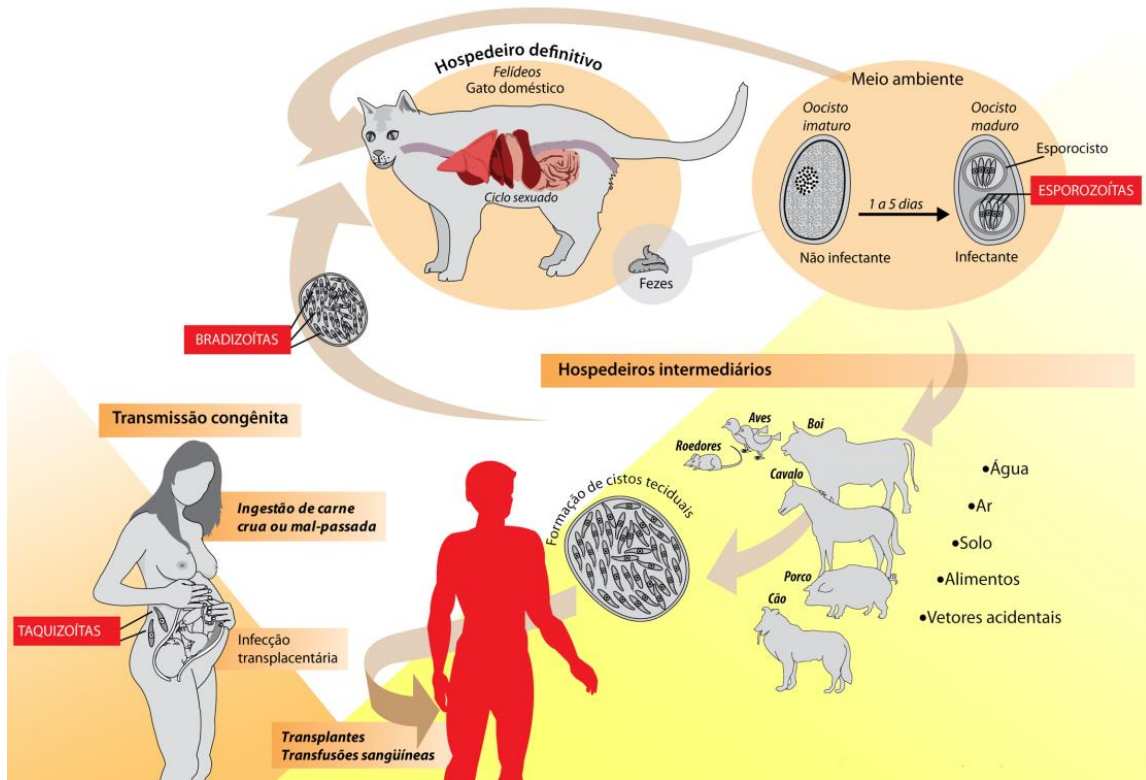
## **1.2. *Toxoplasma gondii***

### **1.2.1. Taxonomia e ciclo biológico**

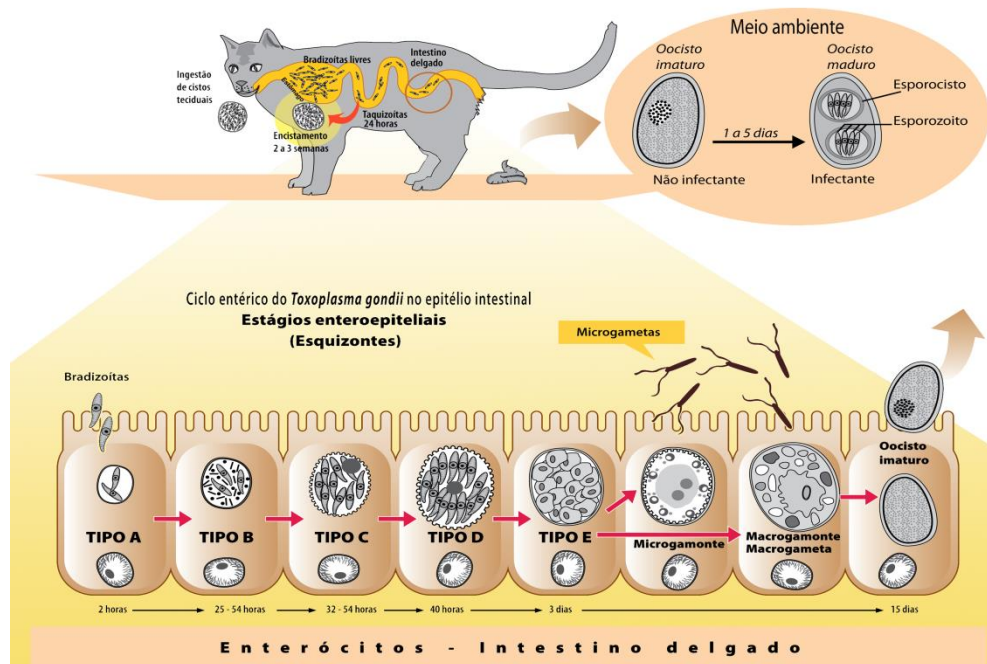
O nome *Toxoplasma gondii* tem sua origem tanto na morfologia do parasito (toxó = arco; plasma = vida) que apresenta forma de arco, quanto no hospedeiro em que foi encontrado pela primeira vez, o roedor *C. gundi* (Nicolle & Manceaux, 1909). Este parasito pertence ao domínio Eukarya, reino Alveolata, filo Apicomplexa, classe Coccídea, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma* e espécie *Toxoplasma gondii* (NCBI Taxonomy, 2013). O parasito tem como hospedeiro definitivo o gato doméstico e outros felídeos e como hospedeiros intermediários uma grande variedade de aves e mamíferos, incluindo o homem. De distribuição mundial, constitui a única espécie representante do seu gênero (Dubey, 2008).

O ciclo biológico do parasito apresenta duas fases distintas, uma assexuada que se desenvolve nos linfonodos e nos tecidos tanto dos hospedeiros definitivos

quanto dos intermediários (**Figura. 1.2**) e uma sexuada ou coccidiana que ocorre exclusivamente nas células do epitélio intestinal de gatos jovens não-imunes e de outros felídeos (hospedeiros definitivos) (Frenkel et al. 1970; Jewell et al. 1972; Dubey, 1994) (**Figura. 1.3**).



**Figura 1.2.** Ciclo biológico do *T. gondii*. Rotas de transmissão entre os hospedeiros definitivos e intermediários (Moura et al., 2009).



**Figura 1.3.** Ciclo biológico do *T. gondii*. Estágio enteroepitelial do *T. gondii* nas células epiteliais do intestino do gato doméstico (Moura et al., 2009).

Uma das formas de infecção dos felídeos é a partir da ingestão de carne de animais como pequenos roedores contendo cistos teciduais (DeFeo, et al., 2002). Uma vez ingeridos, a parede cística é rompida por enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado, liberando bradizoítos que penetram nas células epiteliais intestinais, iniciando os ciclos sexuado e assexuado do *T. gondii* (Dubey & Frenkel, 1972). O ciclo enteroepitelial é caracterizado por uma multiplicação acentuada do parasito nas células do epitélio intestinal dos felídeos dando origem a estágios conhecidos como esquizontes (Speer & Dubey, 2005). Merozoítos liberados dos esquizontes formam os gametas masculino (microgametas) e feminino (macrogametas). Os gametas masculinos evadem do epitélio, caem na luz intestinal e, pela presença de dois flagelos, nadam em direção ao gameta feminino no interior do enterócito, onde ocorre a fertilização (formação do ovo ou zigoto), seguida da formação da parede do oocisto. Assim, formam-se os oocistos que, quando amadurecem, são liberados no lúmen intestinal, quando da ruptura das células enteroepiteliais e a seguir eliminados juntamente com as fezes dos felídeos no ambiente (Hill et al., 2005). No solo, os oocistos esporulam, de um a cinco dias após a sua eliminação com as fezes, tornando-se infectantes. A esporulação é

dependente de fatores ambientais, tais como aeração e temperatura, podendo os oocistos permanecer infectantes no ambiente por meses ainda que em climas secos e frios (Dubey, 1977).

Nos hospedeiros intermediários (por exemplo, o homem), o desenvolvimento da fase assexuada do ciclo do parasito pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos a partir de alimentos, água ou solo contaminados, de cistos contendo bradizoítos a partir de carne crua ou mal cozida ou, mais raramente, de taquizoítos, a partir do leite (Tenter, 2000). O ciclo assexuado envolve dois estágios distintos de crescimento do *T. gondii* a depender da fase da infecção. Na fase aguda, os bradizoítos e esporozoítos liberados no tubo digestivo se diferenciarão em taquizoítos, estágio de multiplicação rápida do parasito (6 a 8 h cada ciclo), após passagem pelo epitélio intestinal. Estas formas invadirão vários tipos celulares e sofrerão divisões sucessivas por endodiogenia, processo em que duas células filhas são formadas dentro da célula-mãe (Sheffield & Melton, 1968; Black & Boothroyd, 2000). Os taquizoítos circulantes na linfa e no sangue são os responsáveis pela disseminação do *T. gondii* no organismo, e conseqüentemente pelo quadro polissintomático da fase aguda da infecção, cuja gravidade depende diretamente da forma e cepa do parasito, bem como do estado imunológico do hospedeiro (Gross et al, 1996; Suzuki, 2002). Diante de uma resposta imune eficaz, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos (estágio de multiplicação lenta) formando os cistos, 7 a 10 dias após a infecção. Na fase crônica da infecção, a cistogênese se estabelece principalmente no SNC e nos músculos, onde os cistos permanecem ao longo de toda vida do hospedeiro (Black & Boothroyd, 2000). Diante de uma resposta imune ineficaz, esses cistos podem sofrer reativação caracterizada pela diferenciação dos bradizoítos em taquizoítos, re-estabelecendo-se o ciclo lítico do parasito (Gazzinelli et al., 1993).

### **1.2.2. Morfologia**

Como visto anteriormente, são três os estágios infectantes do *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Cada um desses estágios apresenta características morfológicas e fisiológicas peculiares e determinantes de suas funções biológicas ao longo do ciclo de vida do parasito.

Os taquizoítos, objeto do presente trabalho, são células polarizadas e alongadas, apresentando a região anterior afilada e posterior arredondada e medindo aproximadamente 6-8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2-3  $\mu\text{m}$  de largura. A região anterior (apical) é caracterizada pela presença do complexo apical, estrutura característica do *T. gondii*, constituído de conóide (apenas em coccídeos), anéis polares, róptrias e micronemas (De Souza et al., 2010). Na região mediana do parasito, se encontra o núcleo e, acima deste, dispõem-se o apicoplasto e o complexo de Golgi. Elementos do retículo endoplasmático podem ser observados compondo o envoltório nuclear com ramificações pelo citossol, além de uma única mitocôndria ramificada. O parasito apresenta ainda grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina (raros), sendo estes de localização e número variáveis. Todo esse conjunto é envolvido por uma película e logo abaixo desta, partindo do anel polar posterior, irradiam-se os microtúbulos subpeliculares (Dubey, 1998; De Souza et al., 2010).

A partir da região apical do protozoário, logo abaixo da membrana plasmática, podem ser observados dois anéis apicais de composição molecular ainda desconhecida. Ainda, abaixo destes, está presente um anel polar, onde se encontra o centro organizador de microtúbulos de onde partem 22 microtúbulos subpeliculares que alcançam 2/3 do corpo do parasito (De Souza, 1972; Morrissette et al., 1997; Morrissette & Sibley, 2002). Nesta região dos anéis polares está presente o conóide, uma estrutura móvel, cilíndrica e oca, formado de moléculas de tubulina. A polimerização da tubulina resulta em fibrilas compostas por nove protofilamentos justapostos em um arranjo espiralado (Hu et al., 2002).

A película que envolve o taquizoíto apresenta estrutura trimembranar sendo formada pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno. Este é constituído de duas unidades de membrana justapostas resultado da íntima associação de longas cisternas achatadas interrompidas logo abaixo dos anéis polares do conóide, no poro da região posterior e na região do microporo (Sheffield & Melton, 1968; Porchet-Hennere et al., 1985). O microporo é uma estrutura formada pela invaginação da membrana plasmática que parece estar envolvida na ingestão de macromoléculas por meio de processo endocítico (Nichols et al., 1994)

Micronemas e róptrias constituem organelas secretórias especializadas, importantes nos processo de adesão e invasão do parasito (De Souza et al., 2010). Os micronemas são estruturas pequenas em formato de bastão, limitados por uma

unidade de membrana e encontrados na extremidade anterior do *T. gondii*. Apresentam um conteúdo homogêneo e eletrondenso, constituído de um grande número de proteínas designadas como “MIC”, com uma variedade de domínios adesivos que medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira (Carruthers & Tomley, 2008). As róptrias, também delimitadas por uma unidade de membrana, têm formato de clava, com uma região basal, mais larga, e uma porção mais afilada voltada para a extremidade apical, conhecida como “pescoço” da organela. Elas existem, aproximadamente, em número de oito nos taquizoítos e apresentam proteínas designadas como “ROPs” e “RONs” de localização diferenciada no interior dessas organelas. A secreção do conteúdo das róptrias parece sequencial à dos micronemas ocorrendo na região apical do parasitondo. Esta secreção contribui para o estabelecimento inicial do vacúolo parasitóforo, que contará, posteriormente, com a secreção constitutiva de proteínas dos grânulos densos (Carruthers et al, 1999; Dlugonska, 2008)

Os grânulos densos são organelas de forma esférica e com grande diversidade de proteínas (as GRAs). Como micronemas e róptrias, também apresentam função secretória, sendo o seu conteúdo proteico secretado após a invasão do parasito na célula hospedeira (Carruthers and Sibley, 1997). No entanto, diferentemente das róptrias e micronemas, a secreção ocorre, majoritariamente, nas regiões posterior e lateral do corpo do parasito (De Souza et al., 2010). Depois de secretadas, GRAs são encontradas tanto na membrana do vacúolo parasitóforo quanto na rede intravacuolar, sendo importantes na manutenção do parasito no interior da célula hospedeira (Karsten et al., 1998; Mercier et al., 2005; Cesbron-Delauw et al., 2008).

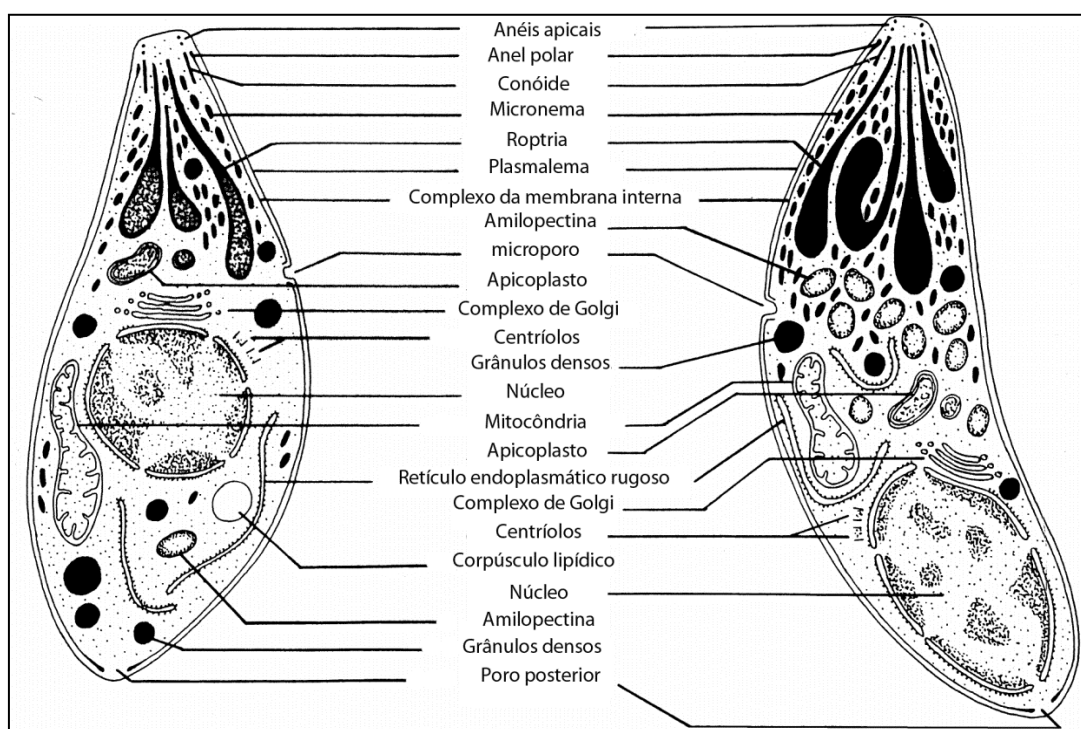
O apicoplasto é uma organela de origem endossimbiótica secundária envolta por quatro membranas e localizada na região anterior do núcleo, adjacente ao complexo de Golgi. Embora identificada desde a década de 1960, apenas muito mais tarde descobriu-se tratar-se de um plastídeo (Kohler et al., 1997), contendo além de DNA nuclear, outros dois de 35kb e 6kb (Gardner et al., 1988). Suas funções conhecidas vão desde a síntese de DNA e proteínas para a manutenção da organela, até a biossíntese de ácidos graxos do tipo II e de isoprenóides (Seeber, 2003).

Outra organela importante no *T. gondii*, mas de função ainda desconhecida, são os acidocalcissomos. De distribuição aleatória no citoplasma do parasito, são



estruturas elétron-densas envoltas por uma única unidade de membrana, apresentando-se em número de 10 e com diâmetro entre 40 e 150 nm. Além de cálcio, essas organelas apresentam magnésio, pirofosfato, polifosfato, oxigênio, potássio, cloro e zinco bem como uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana envolvida com o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e duas bombas de prótons que atuam na acidificação desta organela (Rodrigues et al., 2002; De Souza et al., 2010; Rohloff, et al., 2011).

Poucas diferenças podem ser observadas na ultraestrutura das diferentes formas do *T. gondii*. As rôptrias em bradizoítos são geralmente elétron-densas, em esporozoítos, labirínticas ou uniformemente elétron-densas, e em taquizoítas labirínticas (Figura. 1.3). Os micronemas estão presentes em grande quantidade nos bradizoítos, em número intermediário nos esporozoítos e são pouco abundantes nos taquizoítos e. Os grânulos densos são menos numerosos em bradizoítos do que em esporozoítos e taquizoítos. Outro diferencial importante são os grânulos de amilopectina. Importantes como reserva energética, sendo numerosos em bradizoítos e esporozoítos e ausentes ou raros em taquizoítas (Dubey et al., 1998).



**Figura 1.4.** Representação esquemática da ultraestrutura de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* (Adaptado de Dubey et al., 1998).

### 1.2.3. Interação *T. gondii*-célula hospedeira

Como mencionado anteriormente, o *T. gondii* é capaz de infectar qualquer célula nucleada (Black & Boothroyd, 2000), no entanto alguns tipos celulares são preferencialmente infectados. Apesar da diversidade de células hospedeiras, o parasito tem mostrado tropismo principalmente, por células nervosas e musculares, onde se observa o estabelecimento dos cistos na fase crônica da doença (Innes, 2010). Com relação à resposta imune, os macrófagos e as micróglia têm mostrado um papel importante na resistência contra este parasito (Bogdan & Röllinghoff, 1999; Deckert et al., 2006).

O sucesso da infecção pelo *T. gondii* é devido principalmente à sua facilidade de transmissão para seus hospedeiros intermediários (Blader & Saeij, 2009). Os taquizoítos invadem a célula hospedeira via um mecanismo dinâmico que difere bastante do modo de entrada de outros microorganismos. Tanto em células não fagocíticas quanto em fagócitos profissionais, a invasão tem se mostrado essencialmente ativa (Dobrowolski & Sibley, 1996). Este processo envolve actina e miosina do parasito (Dobrowolski & Sibley, 1996; Dobrowolski et al., 1997) e ocorre a partir da interação de proteínas de sua extremidade apical com receptores da membrana da célula hospedeira.

A internalização se inicia pela adesão da extremidade apical do parasito facilitada pela secreção dos micronemas. A invasão dirigida pela função motora do parasito ocorre após o estabelecimento da junção móvel na membrana plasmática da célula hospedeira que formará o vacúolo parasitóforo. A junção móvel então seletivamente exclui proteínas de membrana Tipo I do vacúolo nascente o que remove sinais para maturação endocítica que parece impedir a fusão fagolisossomal e a consequente eliminação do parasito no interior da célula hospedeira. O vacúolo se estabelece então pela entrega de proteínas do *T. gondii* a partir das roptrias seguida pela secreção constitutiva de proteínas a partir dos grânulos densos (Sinai, 2008).

Após a invasão, o *T. gondii* modula processos biológicos importantes da célula hospedeira visando o estabelecimento da infecção (Blader & Saeij, 2009). Estudos bioquímicos, aliados a análises bioinformáticas mostraram que o parasito é incapaz de sintetizar *de novo* uma série de pequenas moléculas como glicose, aminoácidos, ferro, colesterol e purinas (Schwartzman & Pfefferkorn, 1982; Pfefferkorn, 1984; Coppens et al., 2000; Fox et al., 2004; Gail et al., 2004). Algumas

dessas moléculas difundem-se livremente para o interior do vacúolo parasitóforo, tendo sido proposta a hipótese de que o parasito promove a sua captação por meio de transportadores inseridos na membrana do vacúolo (Coopens et al., 2006).

Outro evento importante para o estabelecimento intracelular do *T. gondii* é a associação de organelas da célula hospedeira com o vacúolo parasitóforo. O recrutamento de organelas como mitocôndria e retículo endoplasmático sugere a captação pelo parasito de alguns nutrientes e/ou metabólitos sintetizados nessas estruturas, como fosfolipídios (Sinai, 2008). Adicionalmente, evidências indicam que em células susceptíveis ao desenvolvimento do *T. gondii* o mesmo é capaz de sequestrar ativamente, para as proximidades e para o interior do vacúolo parasitóforo, lisossomos da célula hospedeira, além de potencialmente acessar a seus conteúdos (Coppens et al., 2006).

### 1.3. Autofagia

O termo autofagia (do grego = comer a si próprio) surgiu em 1967 quando Christian de Duve referiu-se a um processo fisiológico conservado no qual, componentes celulares como proteínas, lipídios, açúcares e organelas são direcionados à degradação no compartimento lisossomal (Deter & Duve, 1967; Eskelinen & Saftig, 2009; Mizushima, 2009; Yang & Klionsky, 2010).

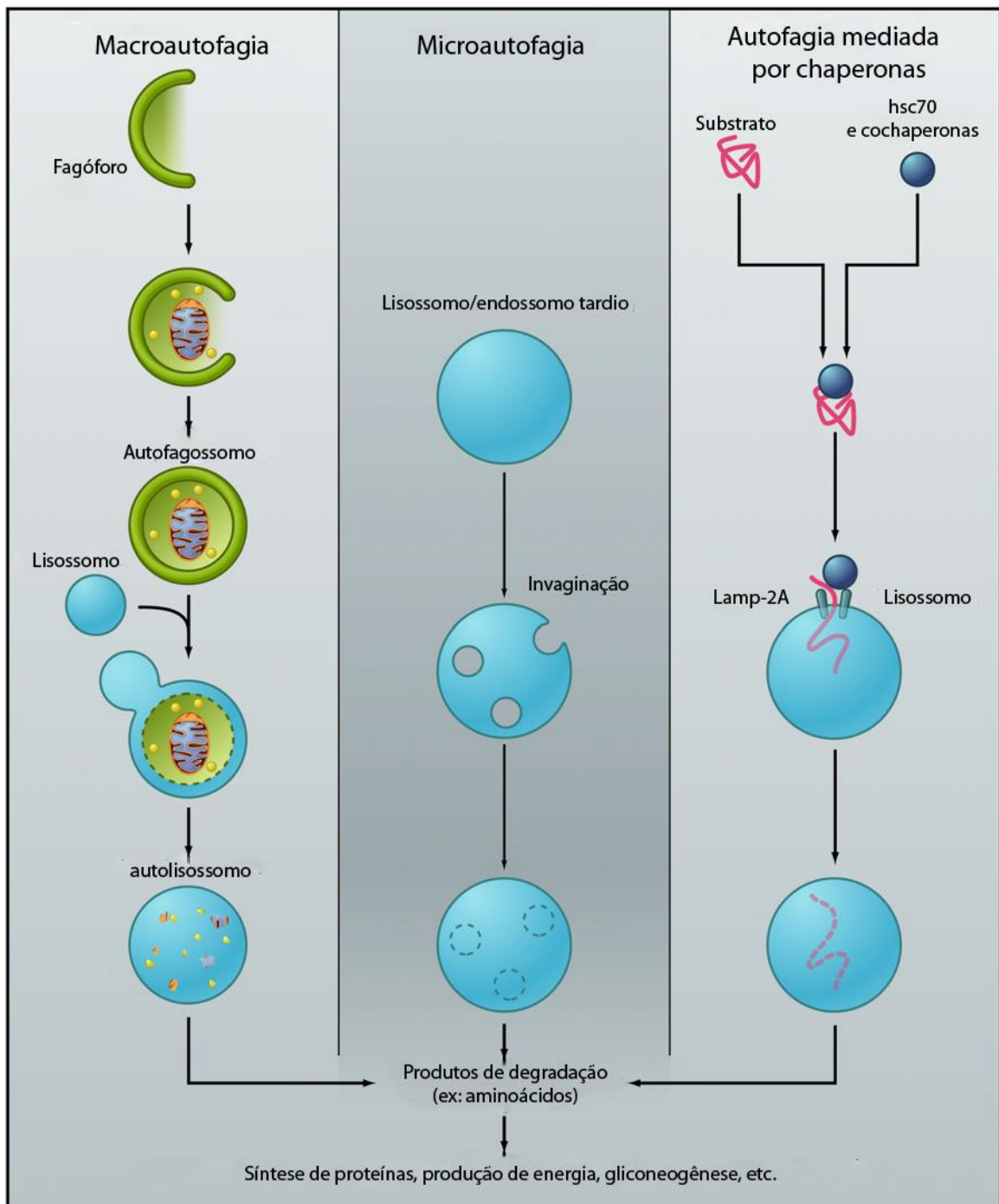
Em níveis basais, a maquinaria autofágica tem mostrado contribuir para a homeostase tanto celular quanto tecidual, bem como, para a regulação do desenvolvimento de eucariotos superiores (Choi et al., 2013). O mau funcionamento desta maquinaria tem sido associado ao desenvolvimento de diversas doenças como mal de Parkinson, mal de Alzheimer, doença de Crohn, e a diferentes tipos de tumores (Ravikumar et al., 2010; Wong & Cuervo, 2010). No que tange à homeostase celular, o processo autofágico tem papel importante na regulação do metabolismo de lipídios e no controle da qualidade de componentes celulares, atuando na reciclagem de organelas com função comprometida e na degradação de agregados proteicos (Sing et al., 2009; Wang & Klionsky, 2011; Lamark & Johansen, 2012). Nesse contexto, a degradação seletiva de organelas específicas pela maquinaria autofágica foi descrita para mitocôndria (mitofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia), peroxissomos (peroxifagia) e corpúsculos lipídicos

(lipofagia), sendo os mecanismos moleculares envolvidos ainda pouco conhecidos (Reggiori et al., 2012).

Em condições cuja autofagia está exacerbada como situações de estresse químico (drogas) ou nutricional (escassez de aminoácidos, açúcares, fatores de crescimento e oxigênio) a degradação de componentes celulares fornece a reciclagem de precursores metabólicos essenciais para a sobrevivência da célula até que a homeostase seja restabelecida (He & Klionsky, 2009; Kroemer et al., 2010; Ravikumar et al., 2010). No entanto, em situações em que a homeostase não pode ser restabelecida, devido ao estresse contínuo, altos níveis de autofagia tendem a favorecer a morte celular pela degradação excessiva de moléculas essenciais e de organelas, caracterizando a morte celular autofágica (Shen & Codogno, 2011).

### 1.3.1. Mecanismos

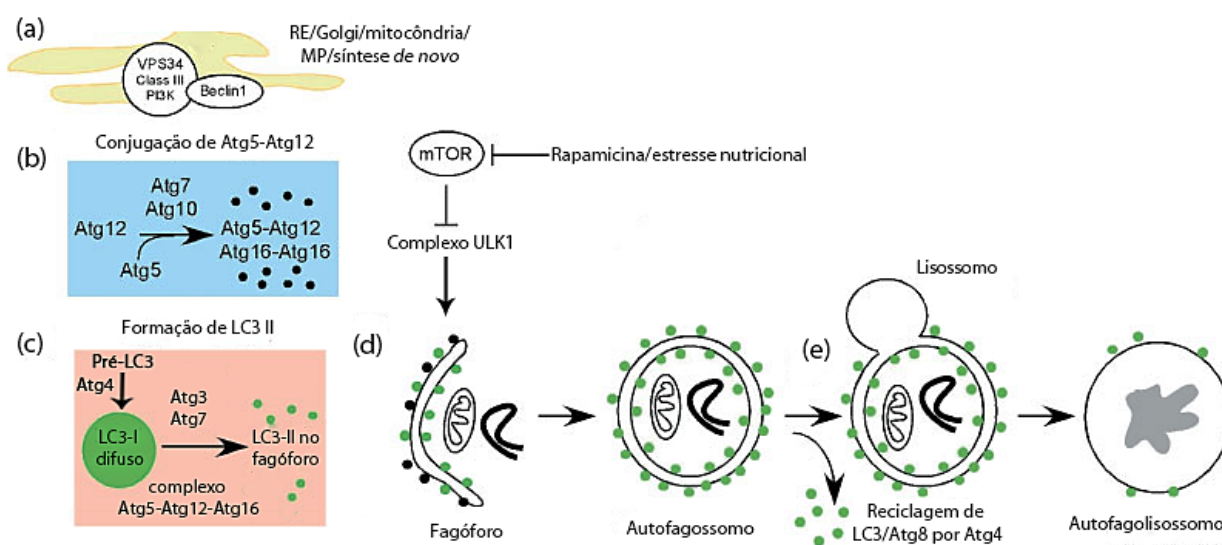
Até o momento, são conhecidos três tipos de autofagia: a macroautofagia e a microautofagia, conservadas em todos os eucariotos, e a autofagia mediada por chaperonas que parece específica de eucariotos superiores (Codogno et al., 2012). (Figura. 1.5).



**Figura 1.5.** Tipos de autofagia (Adaptado de Mizushima & Komatsu, 2011).

### 1.3.1.1. Macroautofagia

A macroautofagia, também conhecida como autofagia clássica, consiste no sequestro de macromoléculas e organelas por estruturas denominadas autofagossomos. Eles circundam o material a ser degradado pelo lisossomo em uma via molecular altamente regulada por proteínas conhecidas como Atgs (proteínas relacionadas à autofagia), descrita inicialmente em leveduras (Klionsky et al., 2003). A maquinaria autofágica pode ser subdividida em cinco etapas: a) formação da membrana isolada ou fagóforo, constituída de dupla bicamada lipídica e dependente de Beclina1 e VPS34 (Takeshige et al., 1992); b) formação do conjugado Atg5-Atg12, interação com Atg16L e alongamento da membrana; c) processamento da proteína LC3 (Atg8 em leveduras) culminando na sua inserção na membrana do fagóforo em desenvolvimento; d) captura de alvos celulares específicos ou randômicos; e por fim, e) fusão do autofagossomo com o lisossomo, seguida pela degradação proteolítica (Glick et al., 2010) (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6.** Macroautofagia (adaptado de Glick et al., 2010)

Em mamíferos, a via que regula negativamente a macroautofagia é controlada por proteína alvo de rapamicina de mamíferos (mTOR). Em condições de abundância nutricional, o complexo mTOR (mTORC1) inibe o complexo serina/treonina proteína quinase (ULK1) (Nazio et al., 2013) impedindo a ativação da autofagia. Sob condições de estresse nutricional, ou ainda sob o tratamento com rapamicina, a atividade de mTOR é inibida, ocorre a ativação do complexo ULK1 e, conseqüentemente, dessa via autofágica, resultando na formação do fagóforo

(Mizushima & Komatsu, 2011). A rapamicina é uma lactona macrocíclica produto da bactéria do solo *Streptomyces hygroscopicus* (Huang et al., 2003), e um conhecido inibidor do complexo TOR tanto em leveduras (Kunz and Hall, 1993; Chang et al., 2009) quanto em células de mamífero (Huo et al., 2011). Além de induzir a autofagia, essa droga é bastante conhecida por suas propriedades imunossupressora, antifúngica e antitumoral (Huang et al., 2003).

A membrana do autofagossomo pode ser originária da membrana plasmática e/ou das membranas de organelas, como o retículo endoplasmático, Golgi e mitocôndria (Militello & Colombo, 2011). Além disso, a síntese *de novo* da membrana no citoplasma, a partir da adição de lipídios via Atg9, também tem sido observada (Kovacs et al., 2007). Experimentalmente, já foi demonstrado que a formação do fagóforo requer a proteína Vps34, uma fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) de classe III que forma um complexo com beclina 1 (Atg6 em leveduras) (Juenemann & Reits, 2012) (**Figura 1.6a**). Em um segundo momento, é necessária a expansão da membrana que envolverá o material a ser degradado. Esse processo ocorre através da participação de dois sistemas independentes. No primeiro, a Atg12 é conjugada à Atg5 em um passo que requer Atg7 e Atg10 (**Figura 1.6b**). No segundo sistema, a protease Atg4 cliva a extremidade C-terminal da LC3 dando origem a isoforma citosólica denominada LC3-I. Em seguida, esta proteína, em uma etapa dependente de Atg3, Atg7 e do complexo Atg5-Atg12-Atg16L, é conjugada a fosfatidiletanolamina do fagóforo tornando-se LC3-II, importante marcador autofagossomal (**Figura 1.6c**) (Tanida et al., 2004; Hanada et al., 2007).

Ao final do processo de expansão da membrana, ocorre a captura de alvos citoplasmáticos que ficam retidos no interior dos autofagossomos, formados após a fusão das extremidades do fagóforo (**Figura 1.6d**). Nesse momento, ocorre a dissociação do conjugado Atg5-Atg12, permanecendo LC3-II associada à membrana da organela. Subsequentemente, ocorre a fusão autofagossomo-lisossomo dando origem a uma nova organela conhecida como autofagolisossomo, na qual os componentes citoplasmáticos são degradados pelas enzimas lisossomais (Mizushima & Komatsu, 2011). Mesmo após a fusão autofagolisossomal, LC3-II permanece associada à membrana por algum tempo, sendo a sua conjugação com a fosfatidiletanolamina clivada pela Atg4, o que promove a sua dissociação da membrana do autofagolisossomo (**Figura 1.6e**) (Satoo et al., 2009).

### **1.3.1.2. Microautofagia**

A microautofagia consiste na captura direta de componentes citoplasmáticos pelo lisossomo (mamíferos) ou vacúolo (plantas e fungos). Nesse processo, a membrana lisossomal/vacuolar sofre invaginação, diferenciando-se em um tubo autofágico contendo porções do citosol. Formam-se então vesículas no lúmen lisossomal (Li et al., 2012) (**Figura. 1.5**). Embora a importância da microautofagia seja clara desde a sua descoberta na década de 60, o seu mecanismo molecular ainda permanece pouco compreendido. Na etapa inicial da microautofagia, a superfície do lisossomo aumenta, dando origem a uma cavidade dinâmica regulada pela GTPase Vps1p, sendo esse processo disparado por estresse nutricional (Uttenweiler et al., 2005). Em seguida, ocorre uma especialização dessa cavidade em um tubo de diâmetro constante, conhecido como tubo autofágico. Vesículas com funções análogas aos autofagossomos surgem a partir desse tubo, expandem, desprendem-se e acumulam no interior dos lisossomos ou endossomos tardios sendo, posteriormente, degradadas por Atg15p e outras hidrolases (Epple et al., 2001). Por fim, a Atg22p atua como uma permease para a reciclagem de nutrientes (Yang & Klionsky, 2007).

### **1.3.1.3. Autofagia mediada por chaperona**

A autofagia mediada por chaperona (AMC) é um tipo de autofagia seletiva, identificada até o momento apenas em células de mamíferos. Ela é responsável pela degradação de componentes citosólicos, principalmente proteínas, nos lisossomos. Nesse tipo de autofagia, o material a ser degradado é reconhecido previamente por uma chaperona citosólica que o direciona para o compartimento lisossomal (Kaushik & Cuervo, 2012) (**Figura. 1.5**). Nesse tipo de autofagia, a chaperona Hsc70 e cochaperonas, reconhecem especificamente proteínas citosólicas que contêm o peptídeo sinal KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Orenstein & Cuervo, 2010) e as direciona para a membrana lisossomal, onde a ligação do substrato à forma monomérica da LAMP-2A promove a formação de um complexo multimérico, necessário para a translocação da molécula a ser degradada para o interior do lisossomo (Bandyopadhyay et al., 2008; Mizushima & Komatsu, 2011).



### 1.3.2. Participação na interação parasito-célula hospedeira

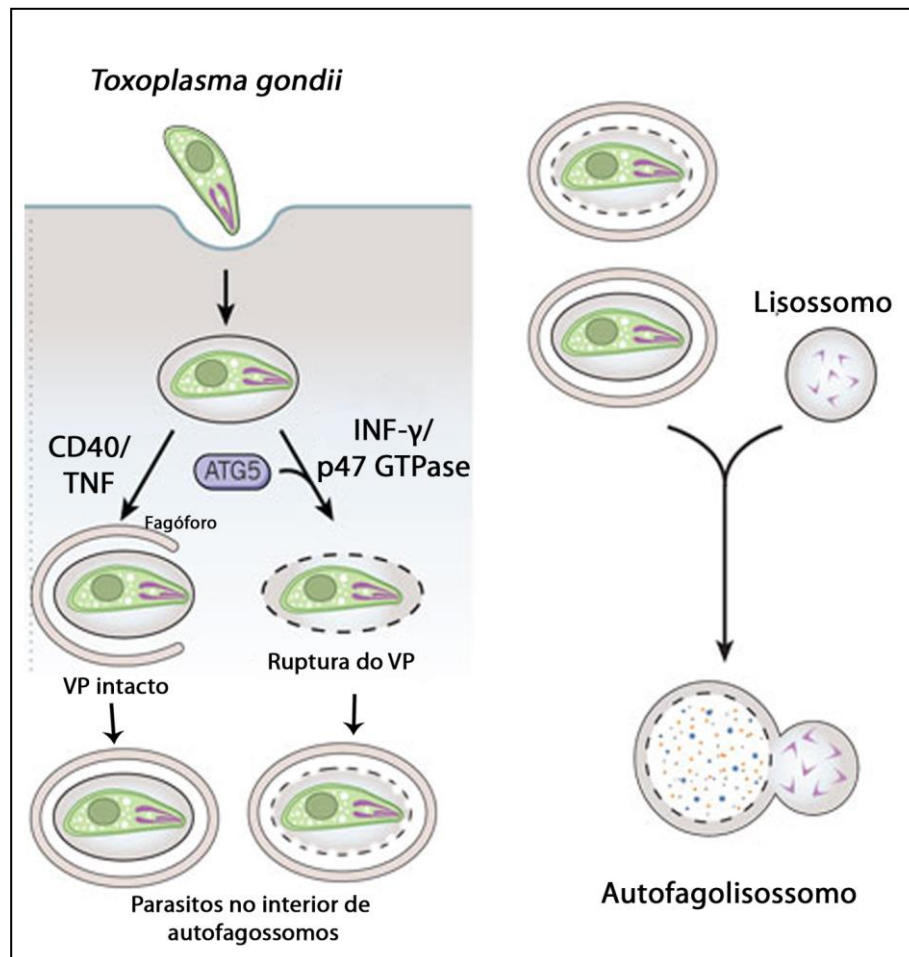
Nos últimos anos, várias evidências têm indicado que a autofagia não está restrita a uma via para reciclagem de componentes celulares sob estresse nutricional. Além da descrição da sua importância no desenvolvimento do organismo, na morte celular, em diferentes patologias, bem como na resposta imune, estudos recentes têm mostrado a sua participação no processo de invasão, utilizado por diferentes patógenos como vírus, bactérias e protozoários, surgindo como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas (Colombo et al., 2006; Huang & Brumell, 2009; Dreux & Chisari, 2010; Duszenko et al., 2011). Independentemente do tipo de microorganismo tem-se observado que a autofagia pode atuar tanto inibindo quanto favorecendo o processo infeccioso (Colombo et al., 2006; Orvedahl & Levine, 2008; Duszenko et al., 2011). No primeiro caso, o evento pode estar relacionado à xenofagia, processo pelo qual toxinas e/ou microorganismos, seja no interior de fagossomos ou no citosol, são direcionados ao fagóforo para posterior fusão lisossomal (Shpilka & Elazar, 2012).

No que tange a autofagia na interação de protozoários com suas células hospedeiras, o que foi descrito até o momento refere-se apenas a tripanosomatídeos patogênicos e *T. gondii*. Na interação *T. cruzi*-hospedeiro a autofagia parece favorecer o processo de invasão desse parasito em fagócitos não profissionais. Em células do epitélio do ovário de hamster chinês superexpressando a proteína LC3, a infecção por tripomastigotas determinou o recrutamento de autofagossomos para o local de entrada do parasito, sugerindo o seu envolvimento na formação do vacúolo parasitóforo (Romano et al., 2009). Entretanto, recentemente, foi mostrado que a exacerbação do processo autofágico seja por estresse nutricional ou rapamicina em macrófagos peritoneais e cardiomiócitos é capaz de reduzir tanto a infecção como a proliferação de *T. cruzi* (Duque, 2013). Em relação à interação *Leishmania amazonensis*-hospedeiro, o que se observa é que a autofagia parece modular positivamente a proliferação do parasito, além de estimular a biogênese de corpúsculos lipídicos (macrófagos), processo esse que parece relacionado ao aumento da carga parasitária. Por outro lado, a indução da autofagia não afetou a infecção de macrófagos com *Leishmania major*, sugerindo que o papel desta via na infecção por este gênero de parasito, seja espécie-dependente (Pinheiro et al., 2009).

Em macrófagos infectados com o *T. gondii*, a imunidade celular mediada por CD40/TNF redireciona o parasito, ainda no interior do vacúolo parasitóforo, para o compartimento lisossomal através da via autofágica (Andrade et al, 2006; Ling et al, 2006). Esse processo resulta na eliminação deste protozoário *in vitro* e *in vivo* de maneira dependente ainda de Beclina-1 e Atg5, (Andrade et al, 2006; Ling et al, 2006).

*In vivo* e *in vitro*, a eliminação do *T. gondii* em macrófagos tem mostrado ser dependente também de guanosina trifosfatase p-47 (GTPase p-47) e interferon gama (INF- $\gamma$ ) (Ling et al, 2006). Nessa condição, GTPases p-47, induzidas por INF- $\gamma$ , promovem a ruptura das membranas do vacúolo parasitóforo e plasmática do *T. gondii*. Uma vez liberado no citoplasma, o parasito já morto é direcionado para a via autofágica para eliminação de seus restos de maneira independente da via de sinalização de CD40/TNF (Ling et al., 2006; Zhao et al., 2007). A eliminação dos parasitos mortos pela via autofágica parece necessária para a sobrevivência da célula hospedeira, uma vez que o acúmulo dos restos destes induz necrose (Duszenko et al., 2011). Assim, IFN- $\gamma$  e CD40 por diferentes vias, levam à degradação autofágica do *T. gondii* em macrófagos (Yap et al., 2007) (**Figura 1.7**).

Entretanto, até o momento, pouco se conhece a respeito do envolvimento da autofagia na interação do *T. gondii* com fagócitos não profissionais. Em fibroblastos ou células HeLa, a infecção com taquizoítos parece induzir a lipidação da LC3, e o acúmulo de autofagossomos próximo ao vacúolo parasitóforo por uma via mTOR-independente. Em fibroblastos deficientes de Atg5 e expostos a concentrações fisiológicas de aminoácidos se observa uma redução na proliferação do parasito sugerindo que o *T. gondii* pode estar utilizando essa via para obtenção de nutrientes visando sua sobrevivência (Wang et al., 2009). Recentemente foi mostrado que em células HeLa tratadas com rapamicina e infectadas com *T. gondii* os níveis de LC3-II e beclina-1 aumentam após 18 e 24 h de infecção, porém são reduzidos após 36 h (Lee et al., 2013). Esses achados sugerem ser a autofagia um mecanismo de sobrevivência de células HeLa nos tempos iniciais de infecção, mas que a proliferação de taquizoítos suprime a via autofágica em tempos mais longos (Lee et al., 2013).



**Figura 1.7.** Eliminação do *T. gondii* em macrófagos pela maquinaria autofágica induzida por CD40/TNF ou por INF- $\gamma$ /GTPase p47 (adaptado de Levine et al., 2011).

Pouca ou nenhuma atenção vinha sendo dada ao emprego de células musculares esqueléticas (CME) como modelo celular nos estudos da toxoplasmose experimental, apesar da sua participação durante a fase crônica desta doença e de seu papel crucial como uma das principais vias de transmissão do parasito, através do consumo de carne crua ou mal passada contaminada (Remington & Cavanaugh, 1965; Weller et al., 1999; Andrade et al., 2001; Barbosa et al., 2005; Guimarães et al., 2002, 2008, 2009; Ferreira-da-Silva et al., 2008, 2009 a, 2009b; Gomes et al., 2011; Bayarri e cols., 2012). Ainda neste contexto, a investigação da participação da autofagia da célula hospedeira durante a interação do *T. gondii* com CME também não foi explorada, embora a importância desta via no processo de infecção desse parasito já tenha sido demonstrada em outros modelos celulares. Adicionalmente, em fagócitos profissionais, de grande importância no processo infeccioso, a autofagia da célula hospedeira parece atuar, conforme visto, de

diferentes formas na eliminação do *T. gondii* sendo necessário um estudo mais aprofundado no que diz respeito aos aspectos morfológicos deste processo.

Frente a esses dados, nossa proposta foi analisar, comparativamente, a participação da autofagia da célula hospedeira induzida ou não por rapamicina ou estresse nutricional na interação do *T. gondii* com células musculares esqueléticas e macrófagos.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- ✓ Avaliar a participação da autofagia na interação *T. gondii*-célula hospedeira.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar o efeito da rapamicina e do estresse nutricional (indutores de autofagia) na infecção e na proliferação de taquizoítos de *T. gondii* em macrófagos peritoneais, CME primárias (miócitos e fibroblastos) e cultura de mioblastos da linhagem C2C12 de camundongo.
- ✓ Avaliar por imunofluorescência a expressão de LC3 (marcador de autofagia) em macrófagos peritoneais e CME primárias na presença de rapamicina ou diante a estresse nutricional.
- ✓ Caracterizar ultraestruturalmente a autofagia em macrófagos e CME infectados na presença de rapamicina ou diante a estresse nutricional.

### **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Parasitos**

Taquizoítos da cepa RH do *T. gondii* foram mantidos em camundongos *Swiss* (12-18g) a partir do inóculo intraperitoneal de  $10^5$  parasitos/animal. Os camundongos foram sacrificados 72 h após a infecção e os parasitos coletados da cavidade peritoneal em salina tamponada com fosfato (PBS). A solução contendo parasitos foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o sedimento celular ressuspense em meio Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM) (Sigma-Aldrich). Os taquizoítos foram quantificados em câmara de Neubauer e utilizados nos ensaios de interação parasito-célula hospedeira. Os animais foram cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz

### **3.2. Culturas de células**

Células musculares esqueléticas (CME) foram obtidas a partir dos músculos das coxas de fetos de camundongos (18<sup>o</sup> dia). Os tecidos foram clivados e incubados em solução de dissociação contendo 0,05% tripsina (Gibco, Grand Island, New York) e 0,01% EDTA (Sigma-Aldrich) em PBS (pH 7,2), como descrito anteriormente em Guimarães et al. (2008). Após 5-7 ciclos de dissociação (7 min cada a 37<sup>o</sup> C), a digestão enzimática do tecido foi interrompida pela adição de DMEM F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) no gelo. Após lavagem em PBS para retirada das enzimas, as células foram ressuspensas em meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 7 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 1% extrato de embrionário de pinto e 1% de solução de antibióticos (*Antibiotic Antimycotic Solution*) (Sigma-Aldrich) e transferidas para garrafa de cultivo (75 cm<sup>2</sup>) (Corning, New York, EUA) por 30 min a 37<sup>o</sup> C em 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após este período, o sobrenadante rico em mioblastos foi coletado e quantificado para plaqueamento.

Macrófagos peritoneais foram obtidos através de lavagem da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* com DMEM F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de solução de antibióticos (*Antibiotic Antimycotic Solution*) (Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram quantificadas e plaqueadas por 1h a 37<sup>o</sup> C para adesão. Após este tempo, o meio de cultura foi trocado por meio novo e as células cultivadas em DMEM F12.



Mioblastos de camundongos da linhagem C2C12 obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil) foram crescidos em DMEM F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de solução de antibióticos. As células foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com repiques a cada 72 h.

O plaqueamento das células foi realizado em lamínulas redondas de vidro (13 mm) em placas de 24 poços (Falcon, Franklin Lakes, EUA) na concentração de 5 x 10<sup>4</sup> (CME), 3 x 10<sup>5</sup> (macrófagos) e 4 x 10<sup>4</sup> (C2C12) células/poço. Alternativamente, para os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão, as células foram plaqueadas em placas de Petri (35 mm) (Falcon) nas concentrações de 5 x 10<sup>5</sup> (CME) e 2 x 10<sup>6</sup> células/placa (macrófagos). Todas as culturas foram mantidas a 37° C em 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> até a realização dos experimentos, sendo os macrófagos e células da linhagem C2C12 cultivados por 24h para os experimentos, e as CME por 120h.

### **3.3. Aspectos éticos**

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as condições de biossegurança adequadas para execução do trabalho. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Fiocruz (licença LW 10/10).

### **3.4. Toxicidade de rapamicina para células hospedeiras**

A toxicidade da rapamicina foi avaliada pelo teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) como previamente descrito (Mosmann, 1983), sendo testadas as faixas de concentração entre 1,56 ng/μL a 100 ng/μL nos diferentes tipos celulares.

### **3.5. Indução de autofagia e seu efeito na infecção pelo *T. gondii***

Foram utilizados como indutores de autofagia a rapamicina (Sigma-Aldrich) e o meio DMEM sem glicose e sem suplementação de SFB (estresse nutricional ou

DMEM/-) (Gibco). Após lavagem em PBS, as células foram incubadas com rapamicina nas concentrações de 20 ng/μL (macrófagos) e 12,5 ng/μL (CME e C2C12) ou submetidas a estresse nutricional por 2 h. Após a incubação, as células foram infectadas na proporção de 3 parasitos/macrófago ou 10 parasitos/célula muscular (CME ou C2C12) por 1 h a 37° C. A indução da autofagia foi mantida até 24 h para todos os tipos celulares estudados. Nos tempos de 6 e 24 h, as células foram fixadas em solução de Bouin por 5 min, lavadas três vezes com álcool 70% e coradas em solução de Giemsa. A quantificação do percentual de infecção e do número de parasitos/célula infectada foi realizada nas diferentes culturas em microscópio de campo claro a partir da contagem mínima de 300 células/lamínula em duplicata. Também foram considerados na avaliação desses parâmetros os fibroblastos das culturas de CME. Para determinação da concentração de parasitos no sobrenadante, todo o volume do meio de cultivo das células foi coletado, após cada tempo e os parasitos extracelulares incubados com azul de tripan (Sigma-Aldrich) e quantificados em câmara de Neubauer.

### **3.6. Imunofluorescência**

Para a detecção da proteína LC3b de autofagossomos, macrófagos e CME (6 e 24 h) foram lavados em PBS e fixados em 4% paraformaldeído por 10 min. Após nova lavagem, as culturas foram incubadas com solução de permeabilização contendo 4% albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 40 min sob agitação. As culturas foram então incubadas com anticorpo primário contra LC3b produzido em coelho (Sigma-Aldrich) por 1 h a 25° C. As células foram então lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário contra coelho acoplado ao fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, EUA) por 1 h a 25° C. Após novas lavagens, as lamínulas foram montadas em meio de montagem octano do diazabicyclo 1.4 [2.2.2] (DABCO, Sigma-Aldrich) e analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A2 (Zeiss, Göttingen, Alemanha). Foram realizados pelo menos 4 experimentos independentes, sendo quantificados os parâmetros: número de células totais LC3 positivas e número de células infectadas LC3 positivas, com no mínimo 200 células/lamínula em duplicata. Células LC3 positivas foram consideradas aquelas com pelo menos um ponto definido de marcação, indicativo de autofagia induzida.

### **3.7. Análise ultraestrutural**

Após a indução de autofagia (6 e 24 h), macrófagos e CME foram fixados em 2,5% solução de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h a 25°C. Após esse período, as culturas foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich) contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e 2,5 mM de cloreto de cálcio por 1 h a 4°C. Após novas lavagens, as células foram raspadas e então submetidas à desidratação em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 2x 100%). Por fim, o material foi embocado em resina PolyBed 812 (Polysciences, Warrington, EUA) e polimerizado por 72 h a 60°C. Subsequentemente, os cortes ultrafinos (60 nm) foram obtidos no ultramicrótomo Ultracuts (Leica, Wien, Austria) e recolhidos em grades de cobre. Os cortes foram contrastados em 1% acetato de uranila e citrato de chumbo para análise no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol, Tóquio, Japão).

### **3.8. Análise estatística**

Todas as análises realizadas empregaram o teste não paramétrico Mann-Whitney para comparar os grupos controle e experimentais. Diferenças com  $p \leq 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Avaliação da toxicidade da rapamicina em células musculares esqueléticas e macrófagos

A toxicidade da rapamicina foi avaliada pelo teste do MTT com concentrações da droga que variaram de 1,56 ng/μL a 100 ng/μL, frente aos três tipos celulares utilizados ao longo deste trabalho. A taxa de sobrevivência aceitável foi estabelecida quando no mínimo 85% das células estavam viáveis. A **Tabela 4.1** mostra as faixas de concentrações que apresentaram baixa toxicidade às células permitindo sua utilização nos ensaios subsequentes.

**Tabela 4.1.** Faixas de concentrações da rapamicina

Células	Rapamicina (ng/μL)
Macrófagos	1,56 - 20
CME primária	1,56 - 12,5
Linhagem C2C12	1,56 - 12,5

Com base nos resultados obtidos foi selecionada a maior concentração de rapamicina que não apresentou citotoxicidade para cada tipo celular. Dessa forma, em todos os experimentos com macrófagos foi utilizada a concentração de 20 ng/μL, e com CME e linhagem C2C12, 12,5 ng/μL

#### 4.2. Avaliação da indução da autofagia na infecção e proliferação do *T. gondii* nos diferentes modelos celulares

##### 4.2.1. Macrófagos

O pré-tratamento dos macrófagos com rapamicina e DMEM/- com manutenção dos estímulos autofágicos inibiu significativamente a infecção e a proliferação do *T. gondii*. Na **Figura 4.1A** pode-se observar que a rapamicina inibiu em cerca de 4% e 41% a infecção após 6 e 24 h de interação, respectivamente. O estresse nutricional foi capaz de inibir a infecção em cerca de 38% já em 6 h de interação, mantendo nível similar no tempo de 24 h. Na **Figura 4.1B** monitorando número de parasitos/célula infectada, observa-se inibição deste parâmetro por rapamicina de 19 e 65% após 6 e 24 h, respectivamente. Paralelamente, o estresse nutricional

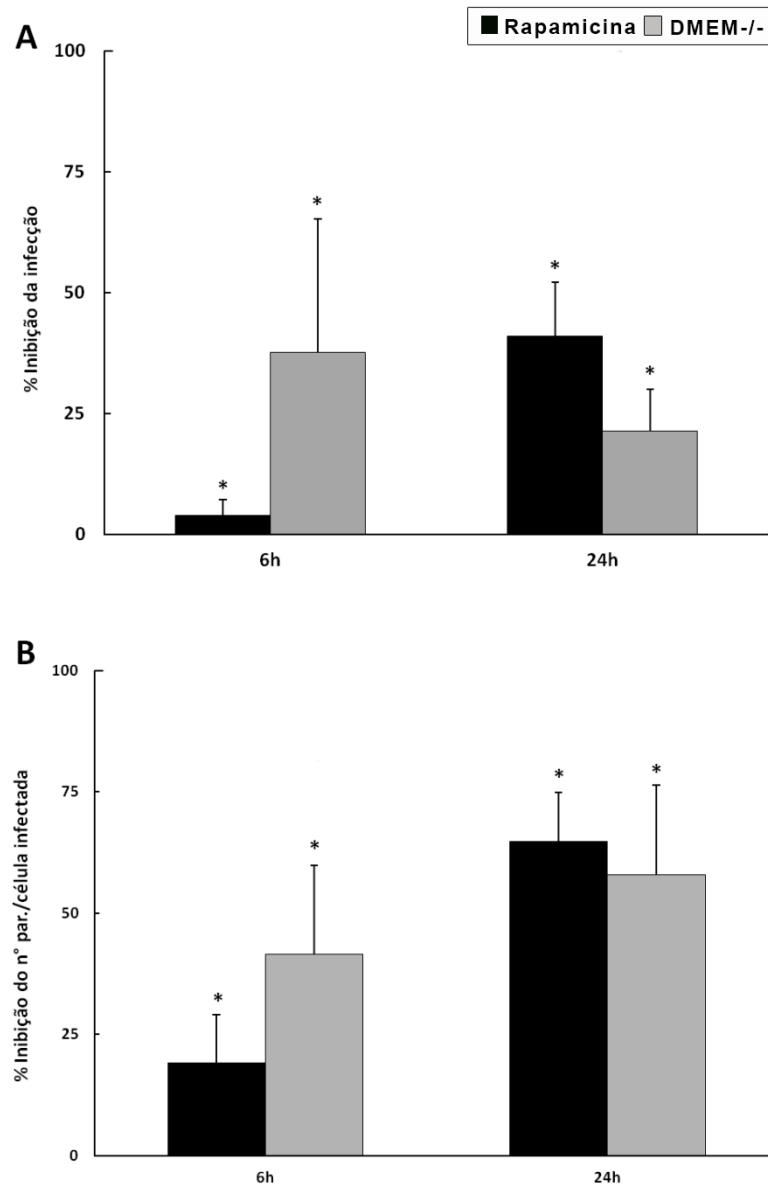
também foi capaz de inibir aproximadamente 42% e 58% a proliferação dos parasitos nos mesmos tempos, respectivamente. A **Figura 4.2** mostra imagens representativas desses experimentos. Ao detectar a presença de taquizoítos no meio extracelular, após 24 h, estes foram coletados e quantificados sendo observada uma diminuição significativa ( $p \leq 0,05$ ) na sua concentração em culturas submetidas aos diferentes estímulos autofágicos (**Figura 4.3**). Neste tempo, uma redução de taquizoítos no meio extracelular de aproximadamente 95 e 77% foi observada nas culturas de macrófagos tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional, respectivamente.

#### **4.2.2. CME**

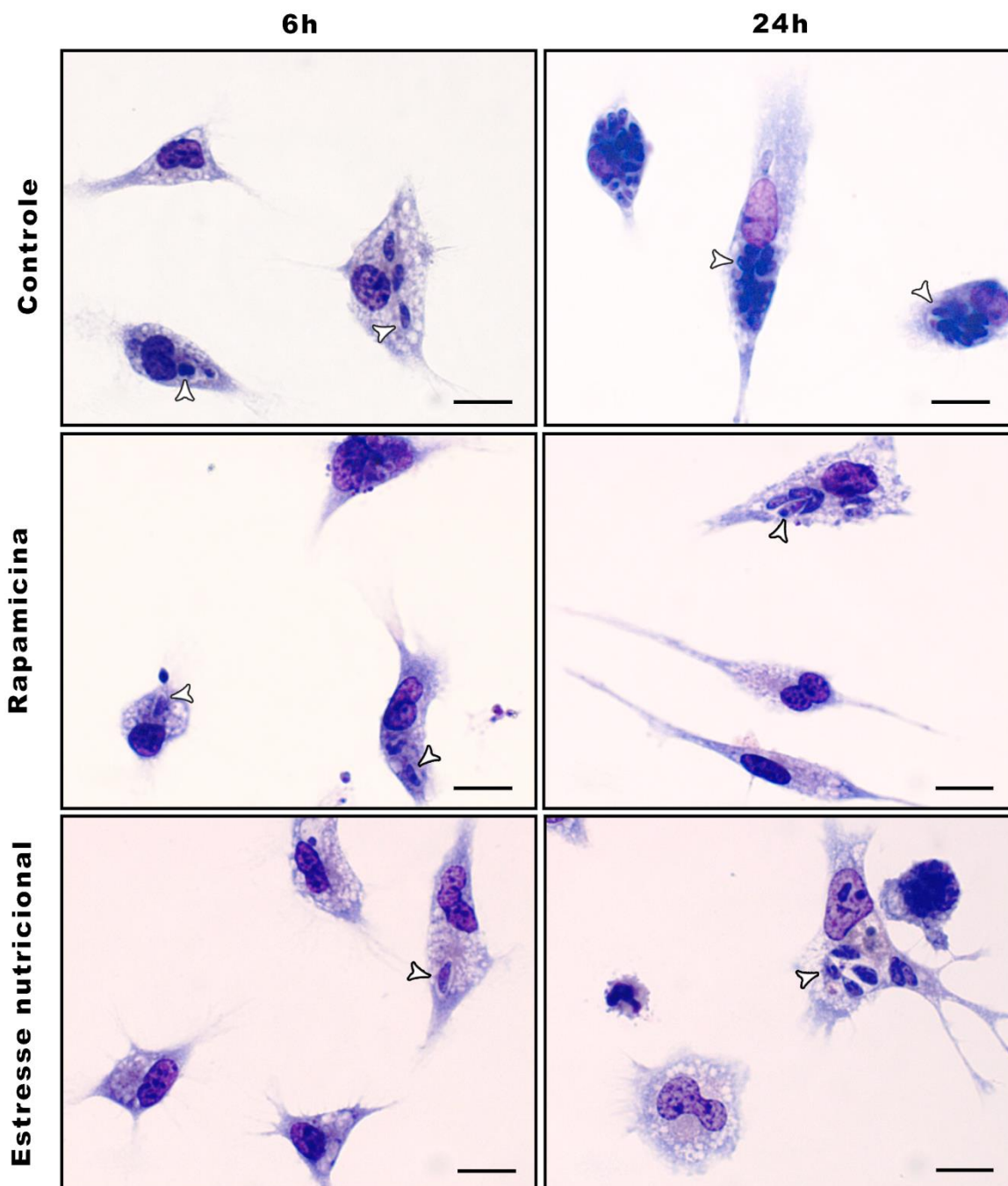
Semelhante ao observado em macrófagos, a indução de autofagia em CME também foi capaz de inibir significativamente a percentagem de infecção e a proliferação do *T. gondii* após 24 h de interação (**Figura 4.4**). Rapamicina e o estresse nutricional inibiram em cerca de 35% a infecção e em cerca de 60% a proliferação do parasito. A Figura 4.5 mostra imagens representativas desses experimentos.

#### **4.2.3. Fibroblastos de cultura de CME**

Após contagem diferencial das mesmas culturas de CME, também foi avaliado o efeito da autofagia na interação de *T. gondii* com fibroblastos primários (**Figura 4.6**). Assim como no item 4.2.2, as condições de indução de autofagia testadas foram capazes de inibir a infecção apenas após 24 h. Nesse tempo, uma inibição de 13 e 24% foi observada para as células submetidas ao estresse nutricional ou tratadas com rapamicina, respectivamente. Em contrapartida, a interferência na proliferação de taquizoítos pôde ser observada já no tempo mais curto, sendo para ambos estímulos autofágicos em torno de 25%, após 6 h, e de 60% após 24 h (**Figura 4.6B**). A figura 4.7 mostra imagens representativas desses experimentos.

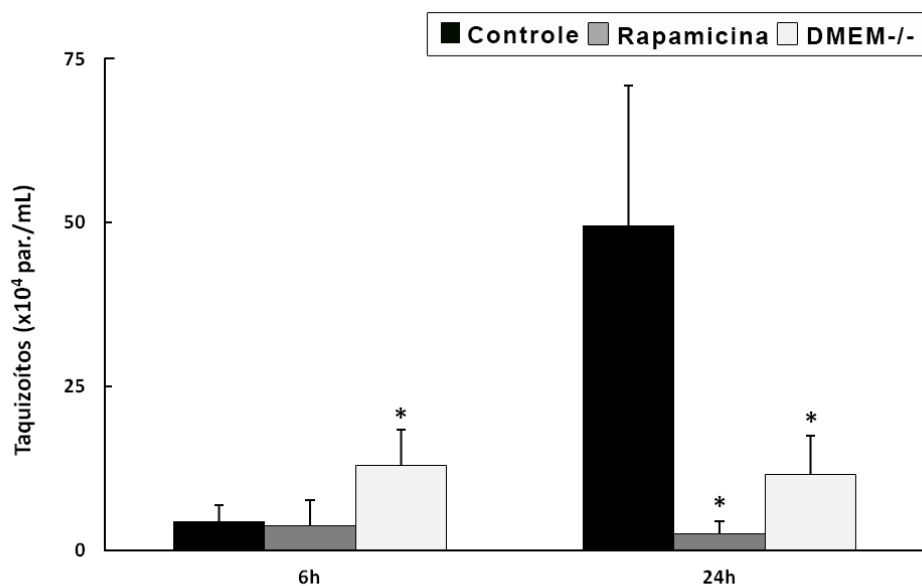


**Figura 4.1. Efeito da indução de autofagia na infecção e na proliferação do *T. gondii* em macrófagos.** Células incubadas com rapamicina (barras pretas) ou submetidas a estresse nutricional (barras cinzas) por 6 e 24 h após a infecção. **(A)** Inibição da percentagem de infecção. **(B)** Inibição do número de parasitos/célula infectada. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 300 células/lamínula em duplicata. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,02$ ).

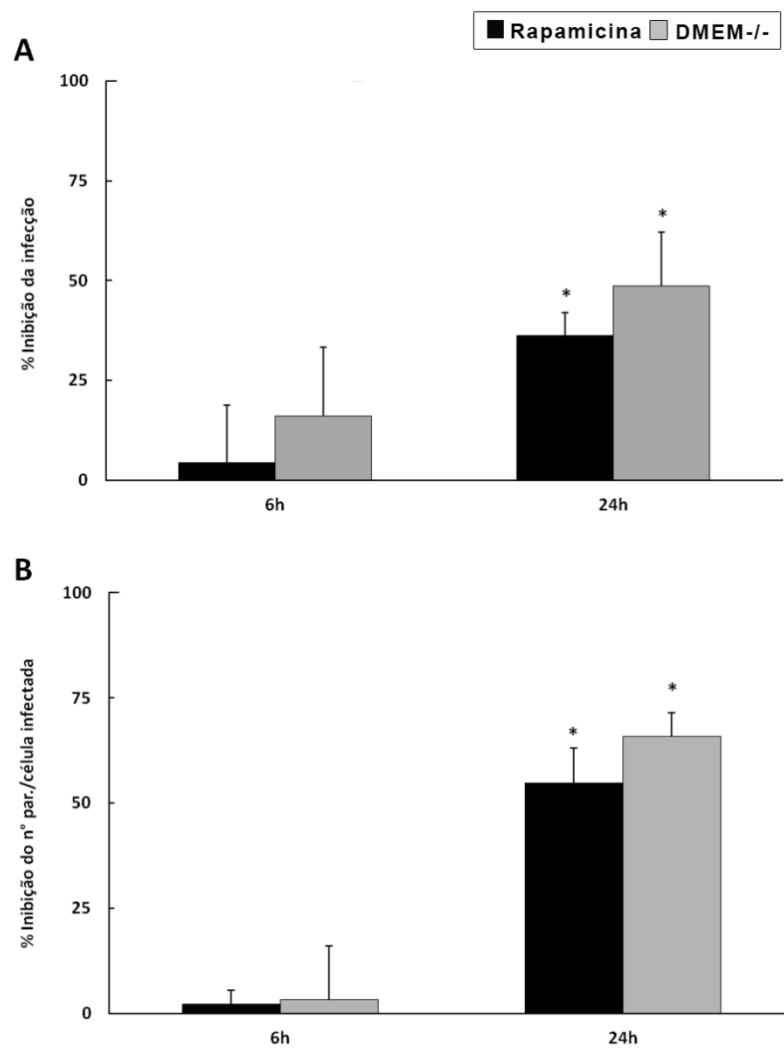


**Figura 4.2. Macrófagos infectados com taquizoítos na proporção de 3:1 (parasito/célula hospedeira) tratados com rapamicina ou submetidos a estresse nutricional durante 6 e 24 h. Setas indicam macrófagos infectados após os diferentes tempos. Rosetas intracelulares correspondentes à multiplicação dos parasitos podem ser observadas no controle com 24 h de infecção, o que não se observa nas células tratadas. Barras: 10  $\mu$ m**





**Figura 4.3. Efeito da indução de autofagia no número de parasitos no sobrenadante de macrófagos.** Concentração de parasitos no sobrenadante foi quantificada nas culturas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional por 6 e 24 h após a infecção. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes em duplicata. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 4.4. Efeito da indução de autofagia na infecção e na proliferação do *T. gondii* em CME.** Células incubadas com rapamicina (barras pretas) ou submetidas a estresse nutricional (barras cinzas) por 6 e 24 h após a infecção. **(A)** Inibição da percentagem de infecção. **(B)** Inibição do número de parasitos/célula infectada. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 300 células/lamínula em duplicata. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).

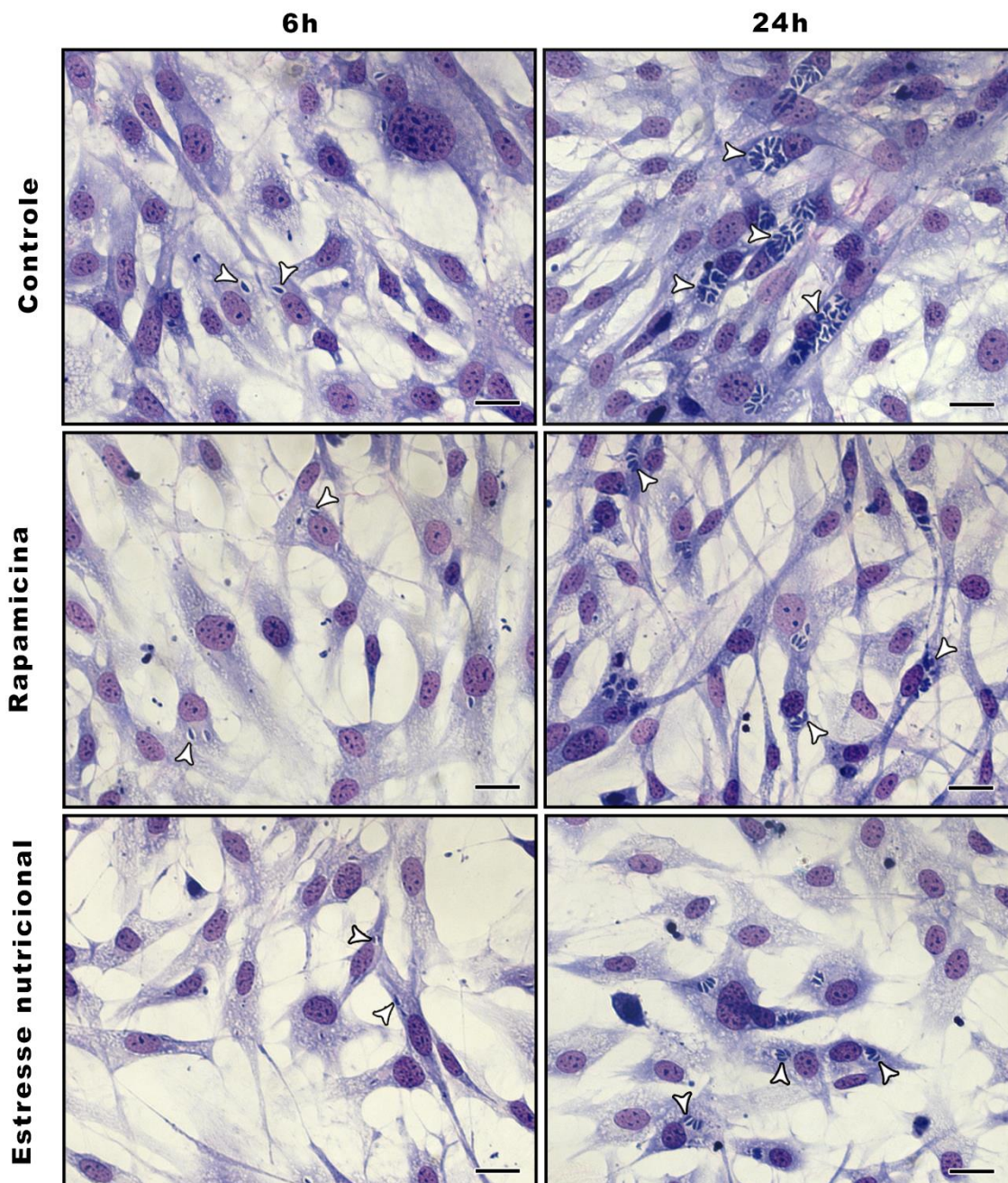
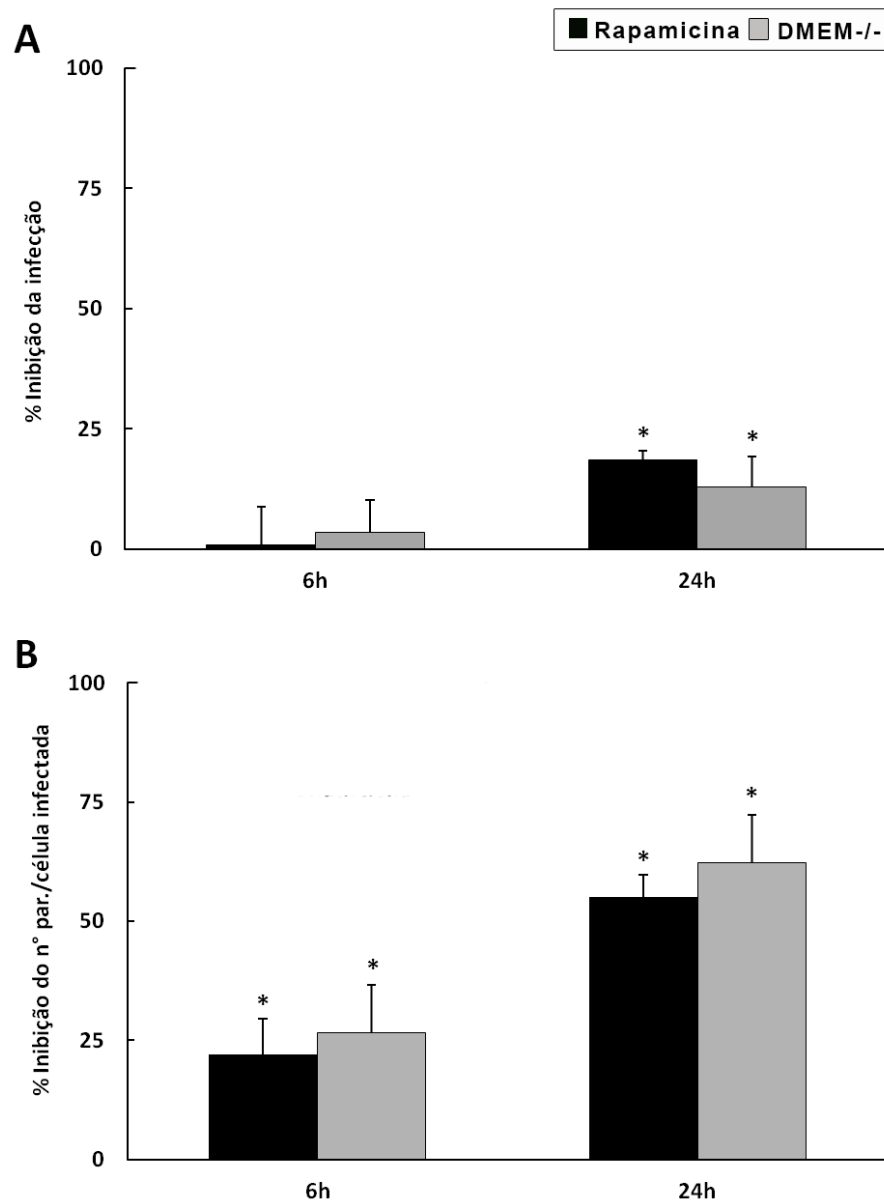
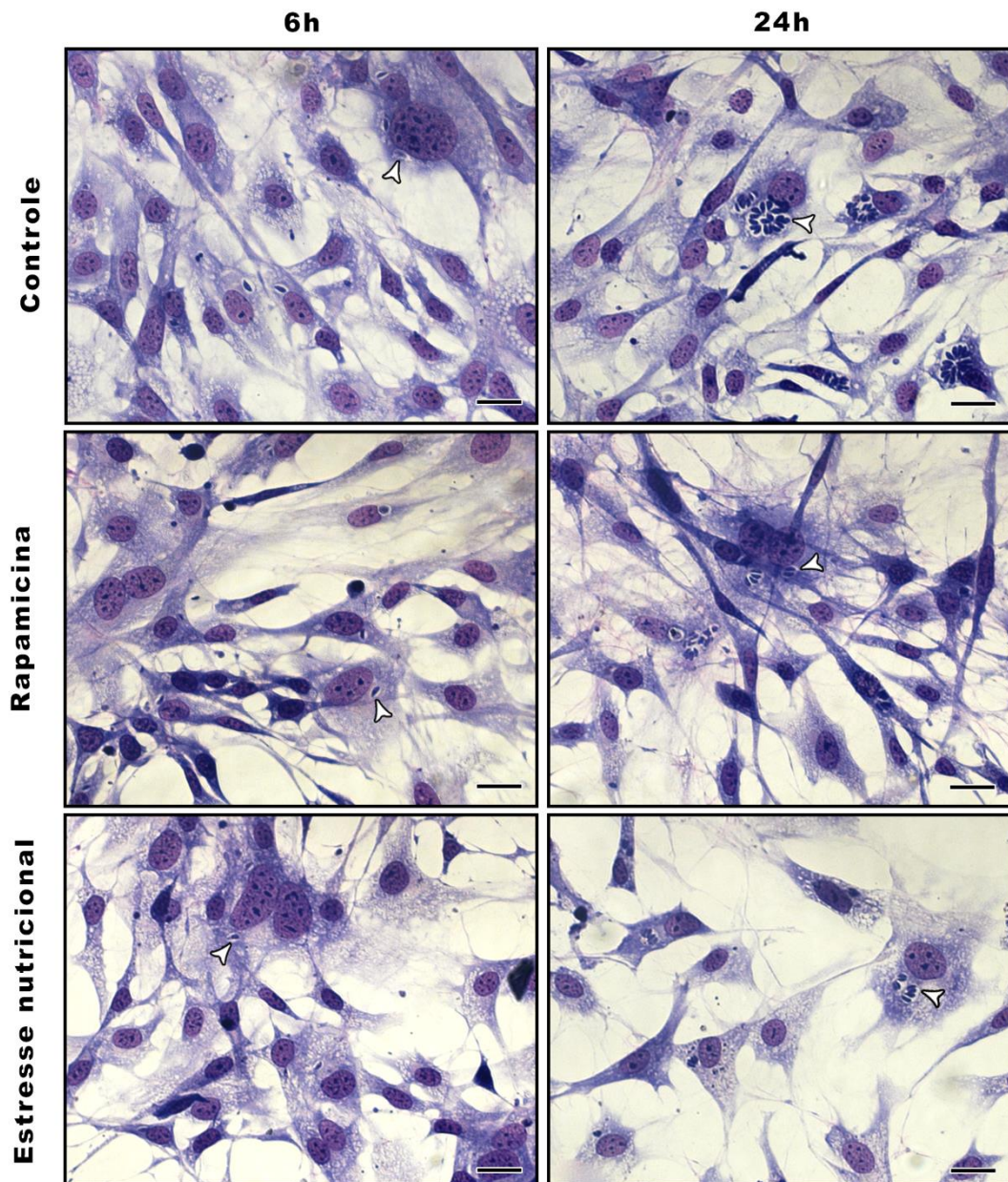


Figura 4.5. CME infectadas com taquizoítos na proporção de 10:1 (parasito/célula hospedeira) tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional durante 6 e 24 h de interação. Setas indicam as células infectadas após os diferentes tempos. Rosetas intracelulares correspondentes à multiplicação dos parasitos podem ser observadas no controle com 24 h de infecção, o que não se observa nas células tratadas. Barra: 20  $\mu$ m



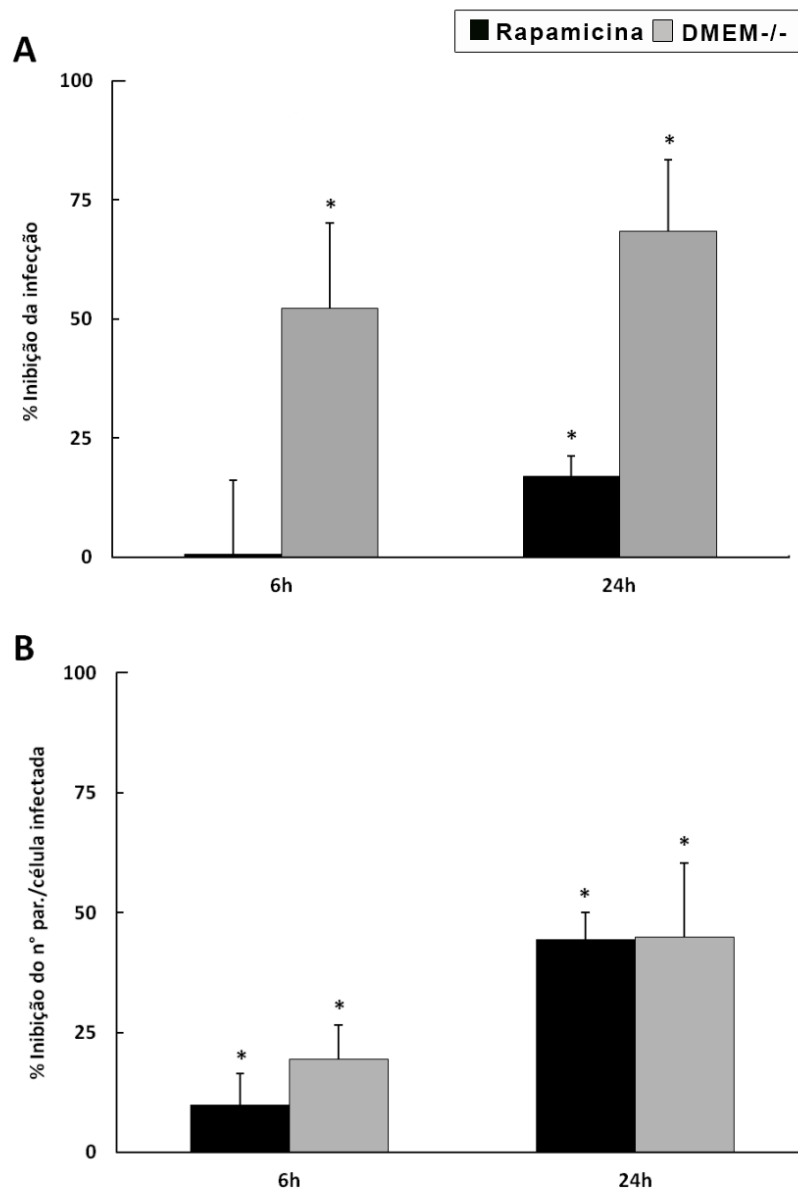
**Figura 4.6. Efeito da indução de autofagia na infecção e na proliferação do *T. gondii* em fibroblastos de cultura de CME.** Células incubadas com rapamicina (barras pretas) ou submetidas a estresse nutricional (barras cinzas) por 6 e 24 h após a infecção. **(A)** Inibição da percentagem de infecção. **(B)** Inibição do número de parasitos/célula infectada. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 300 células/lamínula em duplicata. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).



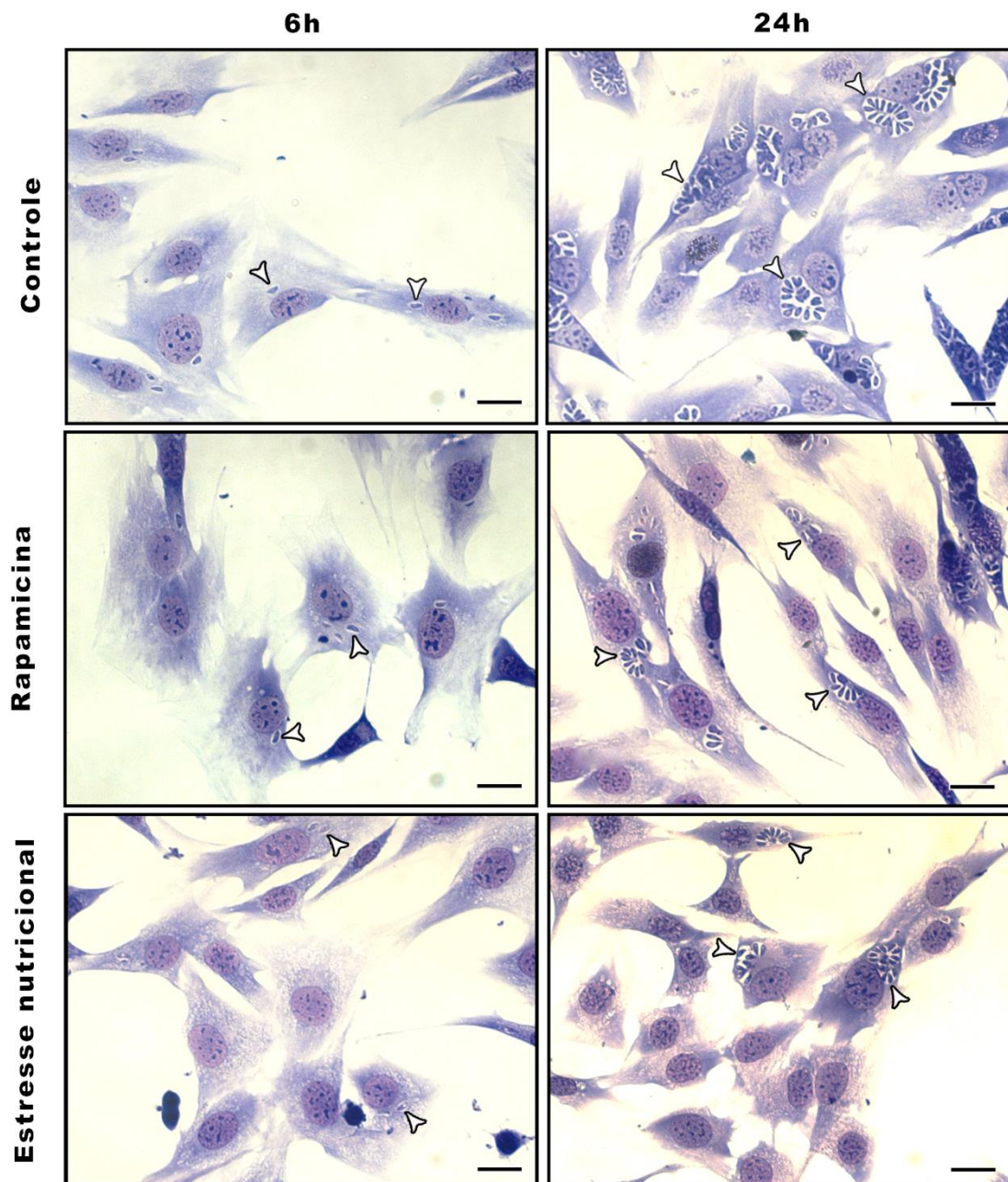
**Figura 4.7.** Fibroblastos provenientes de cultura primária de CME infectados com taquizoítos na proporção de 10:1 (parasito/célula hospedeira) tratados com rapamicina ou submetidos a estresse nutricional durante 6 e 24 h. Setas indicam os fibroblastos na cultura de CME. Rosetas intracelulares correspondentes à multiplicação dos parasitos podem ser observadas no controle com 24 h de infecção, o que não se observa nas células tratadas. Barra: 20  $\mu$ m

### 4.2.3. Linhagem C2C12

Para fins de comparação, também foi analisado o efeito da rapamicina em células musculares da linhagem C2C12 infectadas com *T. gondii*, sendo constatada uma inibição nos dois parâmetros avaliados (% infecção e n° par./célula infectada) (**Figura 4.8**). Após 6 h de interação, o estresse nutricional foi capaz de inibir significativamente a infecção (50%), o que não foi observado para o tratamento com rapamicina. Em contrapartida, ambas as condições de estresse inibiram significativamente, a infecção após 24 h de interação, em cerca de 17% para a rapamicina e de 70% durante a escassez de nutrientes (**Figura 4.8A**). Os efeitos de ambos os estímulos autofágicos inibiram a proliferação do parasito entre 10 e 15% após 6 h alcançando cerca de 44% no tempo de 24 h (**Figura 4.8B**). A Figura 4.9 mostra imagens representativas desses experimentos.



**Figura 4.8.** Efeito da indução de autofagia na proliferação do *T. gondii* em células da linhagem C2C12. Células incubadas com rapamicina (barras pretas) ou submetidas a estresse nutricional (barras cinzas) por 6 e 24 h após a infecção. **(A)** Inibição da percentagem de infecção. **(B)** Inibição do número de parasitos/célula infectada. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 300 células/lamínula em duplicata. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).



**Figura 4.9.** Linhagem de células C2C12 infectadas com taquizoítos na proporção de 10:1 (parasito/célula hospedeira) tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional durante 6 e 24 h. Setas indicam as CME infectadas após os diferentes tempos. Rosetas intracelulares correspondentes à multiplicação dos parasitos podem ser observadas no controle com 24 h de infecção o que não se observa na maioria das células tratadas. Barras: 20  $\mu$ m

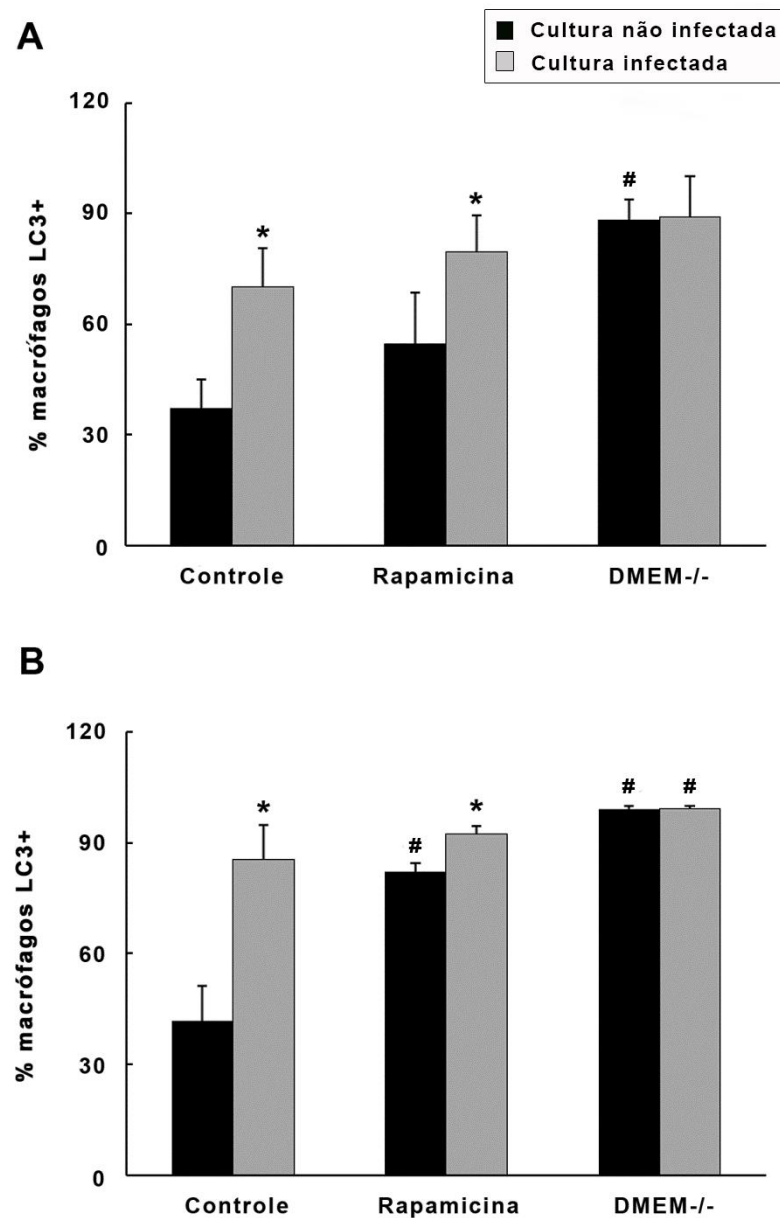


### **4.3. Avaliação da expressão de LC3 na interação *T. gondii*-célula hospedeira**

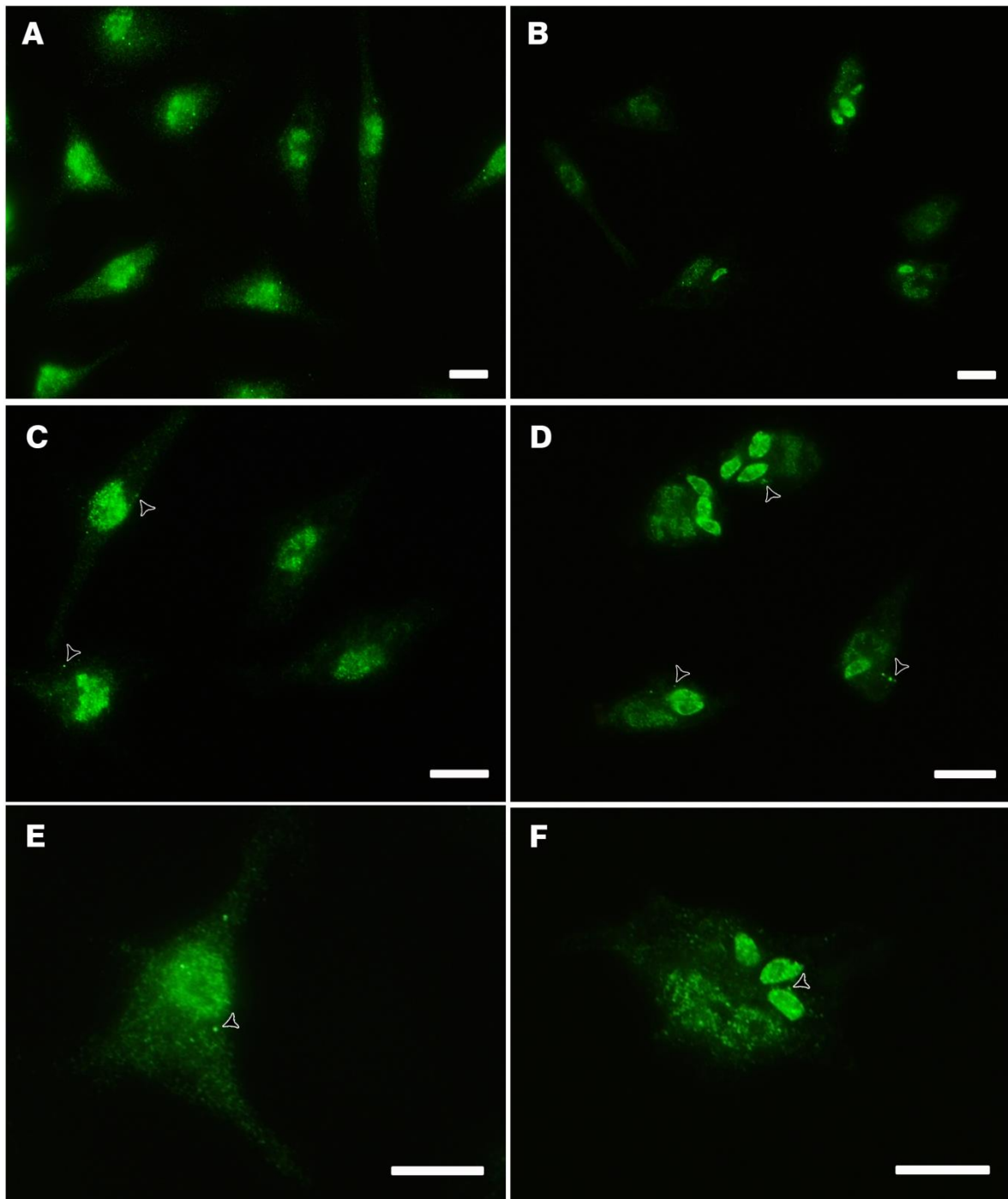
#### **4.3.1. Macrófagos**

A infecção induziu um aumento no percentual de células totais LC3+ em 6 e 24 h nas culturas não tratadas de cerca de 2x e nas tratadas com rapamicina na faixa 1,1-1,5x. Não foram observadas alterações, com relação a esse parâmetro, entre culturas não infectadas e infectadas quando incubadas em DMEM/- nos dois tempos de tratamento (**Figuras 4.10-4.16**). Foram observados pontos de LC3 próximos ao parasito em todas as condições em ambos os tempos analisados (**Figuras 4.11D, 4.11F, 4.12D, 4.13D, F, 4.14F, 4.15D, 4.16F**). Em 6 e 24 h, rapamicina também induziu a formação de vacúolos no parasito e nas proximidades do vacúolo parasitóforo, que aumentaram de tamanho no curso do tempo (**Figuras 4.12F, 4.15B, 4.15D, 4.15F**). A incubação com DMEM/- induziu, apenas em 24h, um aumento discreto no percentual de células LC3+ nas culturas infectadas (**Figura 4.10B**). Já em culturas de macrófagos não infectadas, a submissão ao estresse nutricional induziu, em 6 e 24 h, um aumento de 2,4x nesse parâmetro (**Figura 4.10**). Nas mesmas culturas, o tratamento com rapamicina induziu, apenas em 24 h, um aumento de 2x no número de células LC3+. (**Figura 4.10B**).

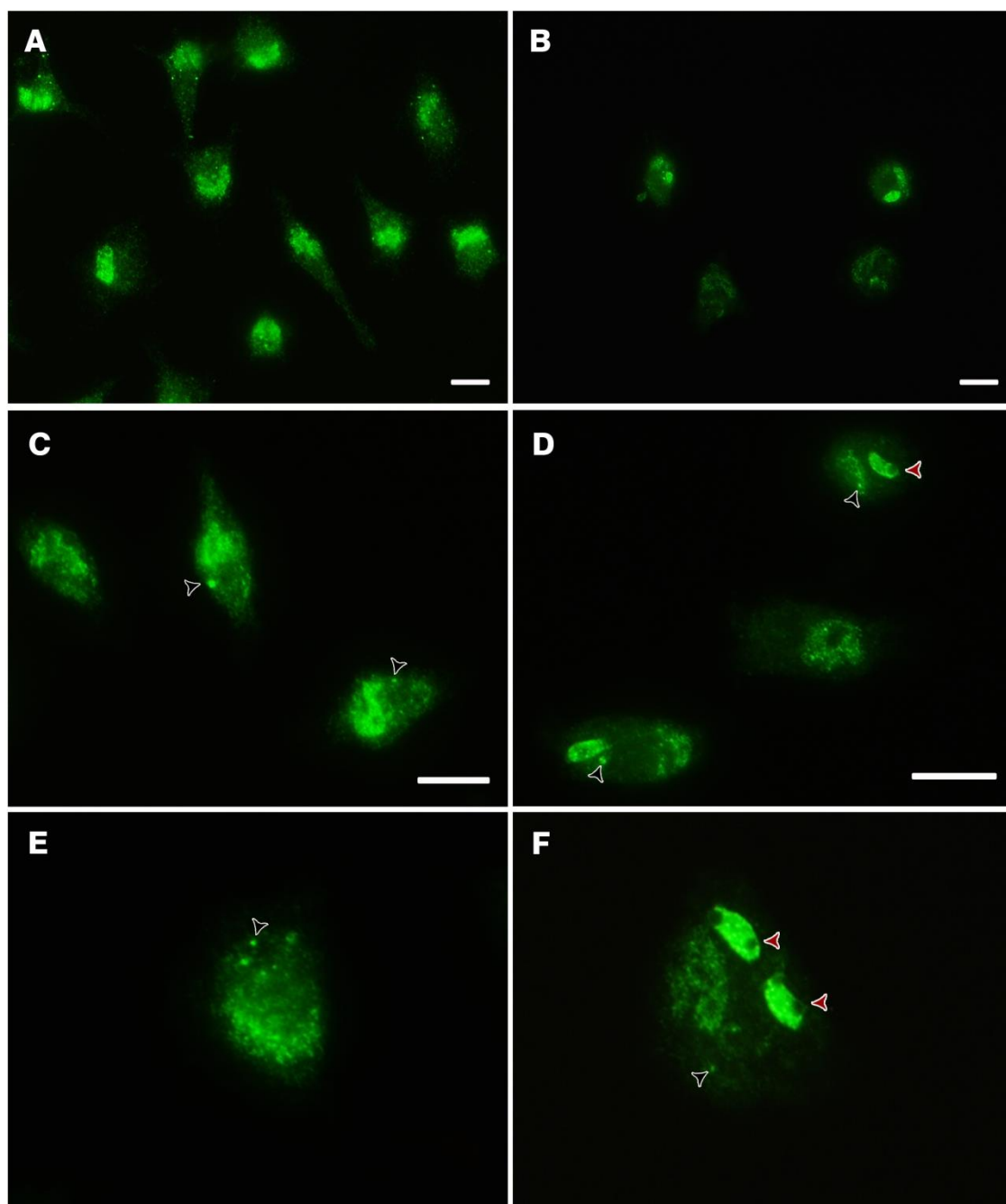
A análise de imunofluorescência apenas em macrófagos infectados mostrou que mais de 90% foram LC3+ independentemente do tratamento e do tempo de análise (**Figura 4.17**). Além disso, não foi observada diferença significativa no número de células infectadas LC3+ entre os macrófagos controle e os incubados com rapamicina ou DMEM/-.



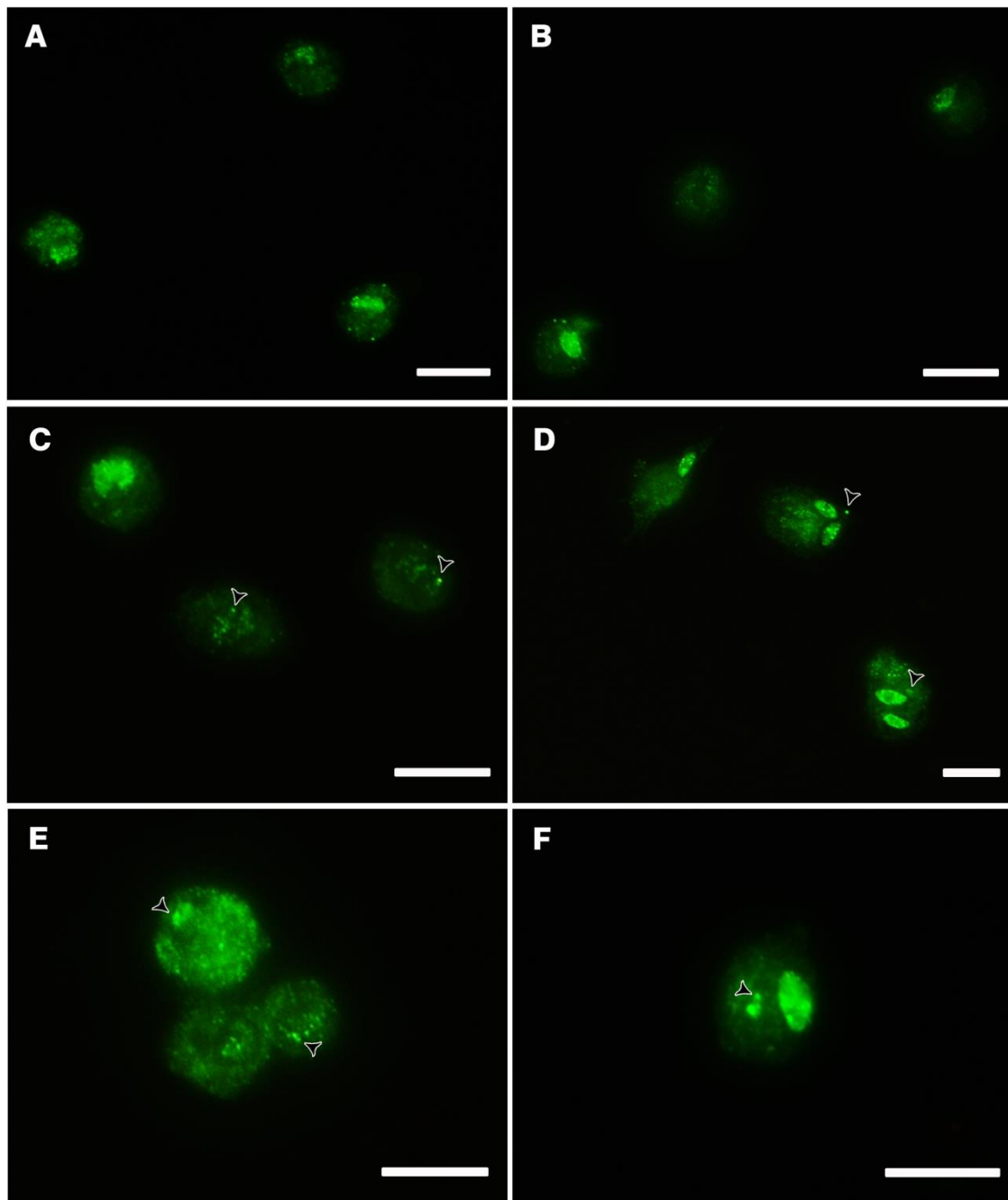
**Figura 4.10.** Análise por imunofluorescência da expressão da proteína autofágica LC3 em culturas de macrófagos não infectadas (barra preta) e infectadas (barra cinza) submetidas ou não a estímulos autofágicos. Foi avaliado o número de células LC3+ em 6 h (A) e 24 h (B) de infecção. Rapamicina e o estresse nutricional foram mantidos durante todo o experimento. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 200 células/lamínula em duplicata. Diferenças significativas são representadas por um asterisco para culturas não infectadas X infectadas, e jogo da velha, para culturas não tratadas X tratadas ( $p \leq 0,05$ ).



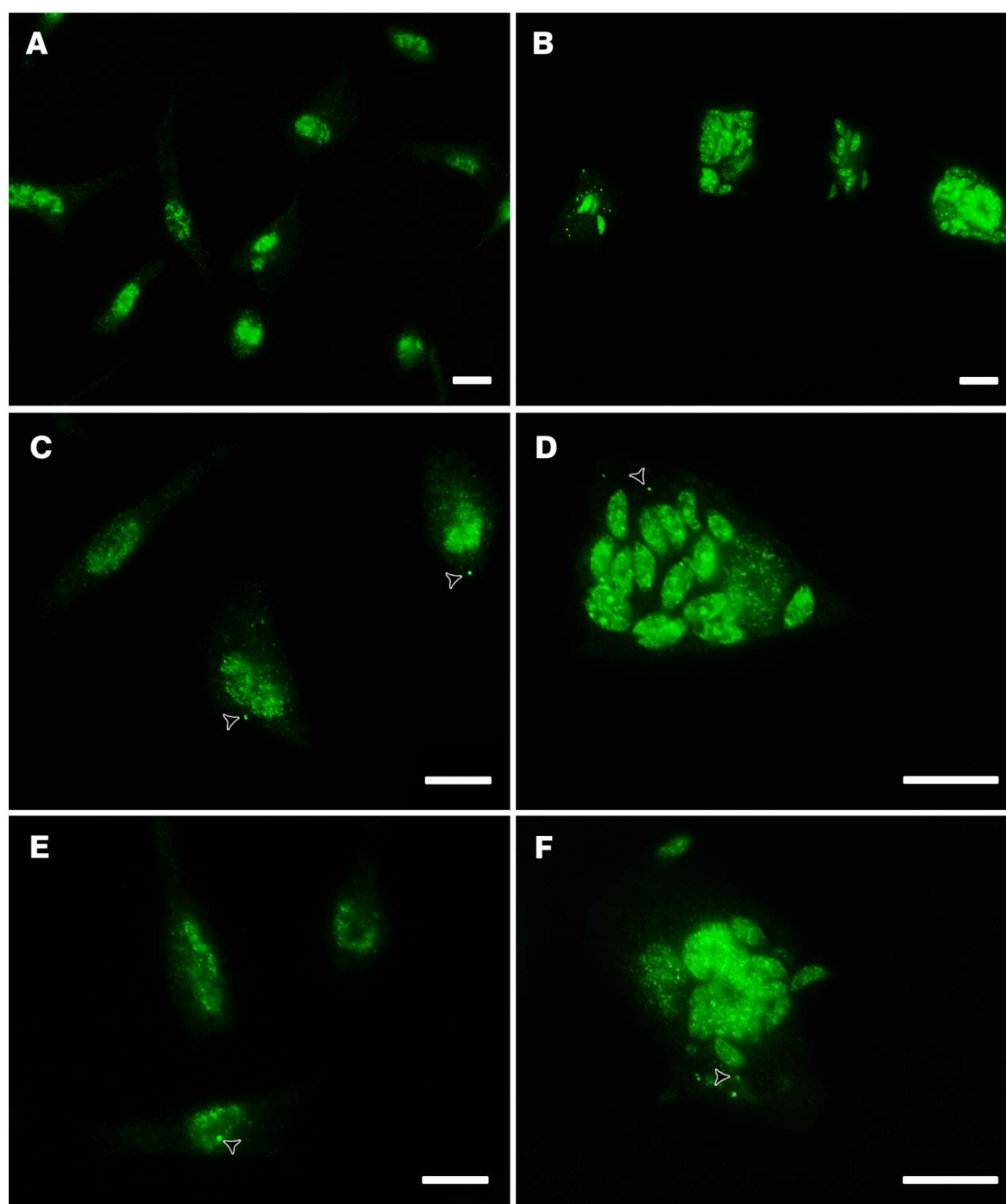
**Figura 4.11. Imunofluorescência para LC3 de culturas de macrófagos infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 6 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma. Barras: 10  $\mu$ m.**



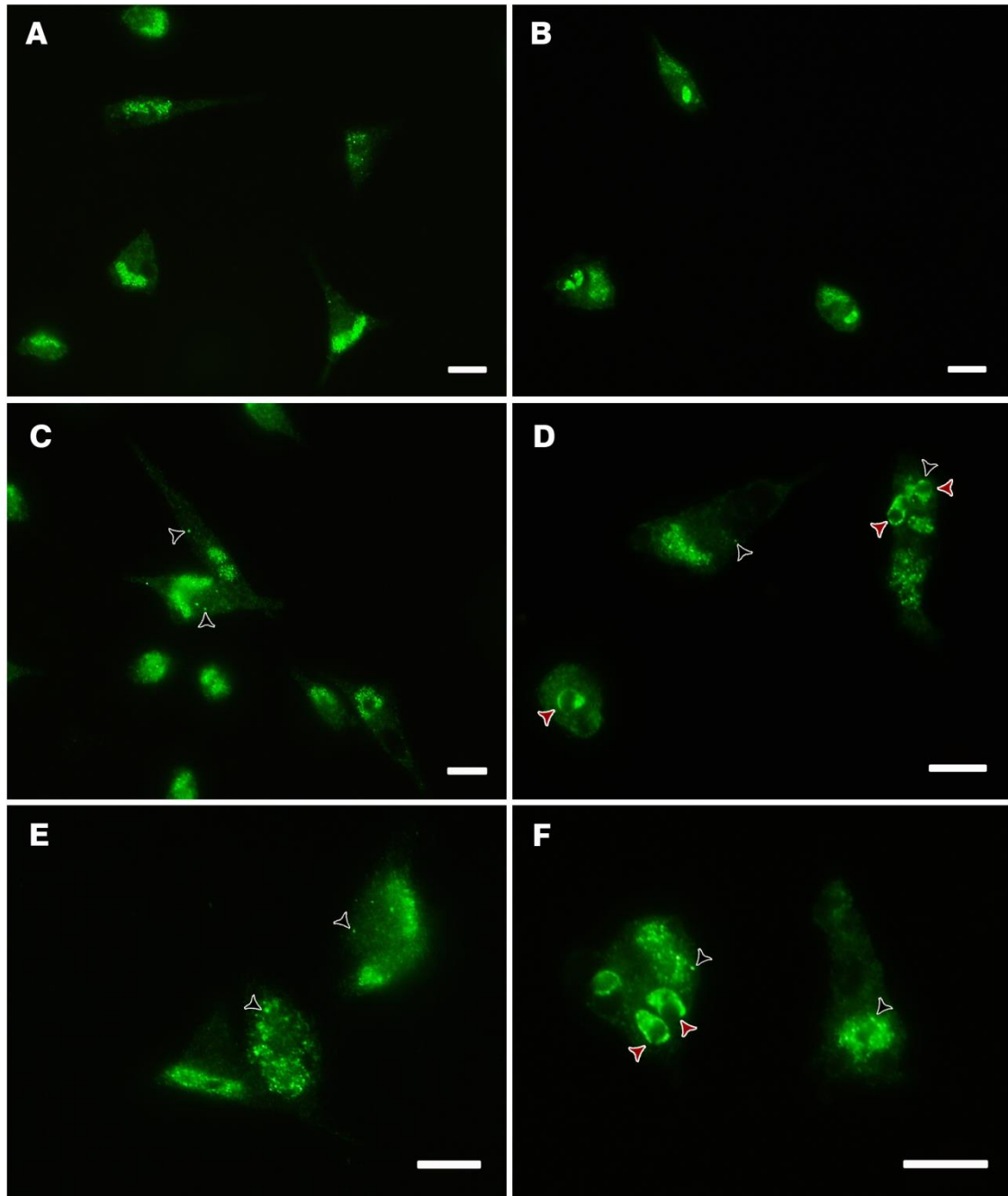
**Figura 4.12.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de macrófagos tratadas com rapamicina e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 6 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas e vermelhas indicam pontos de LC3 no citoplasma dos macrófagos e parasitos vacuolizados, respectivamente. Barras: 10 μm.



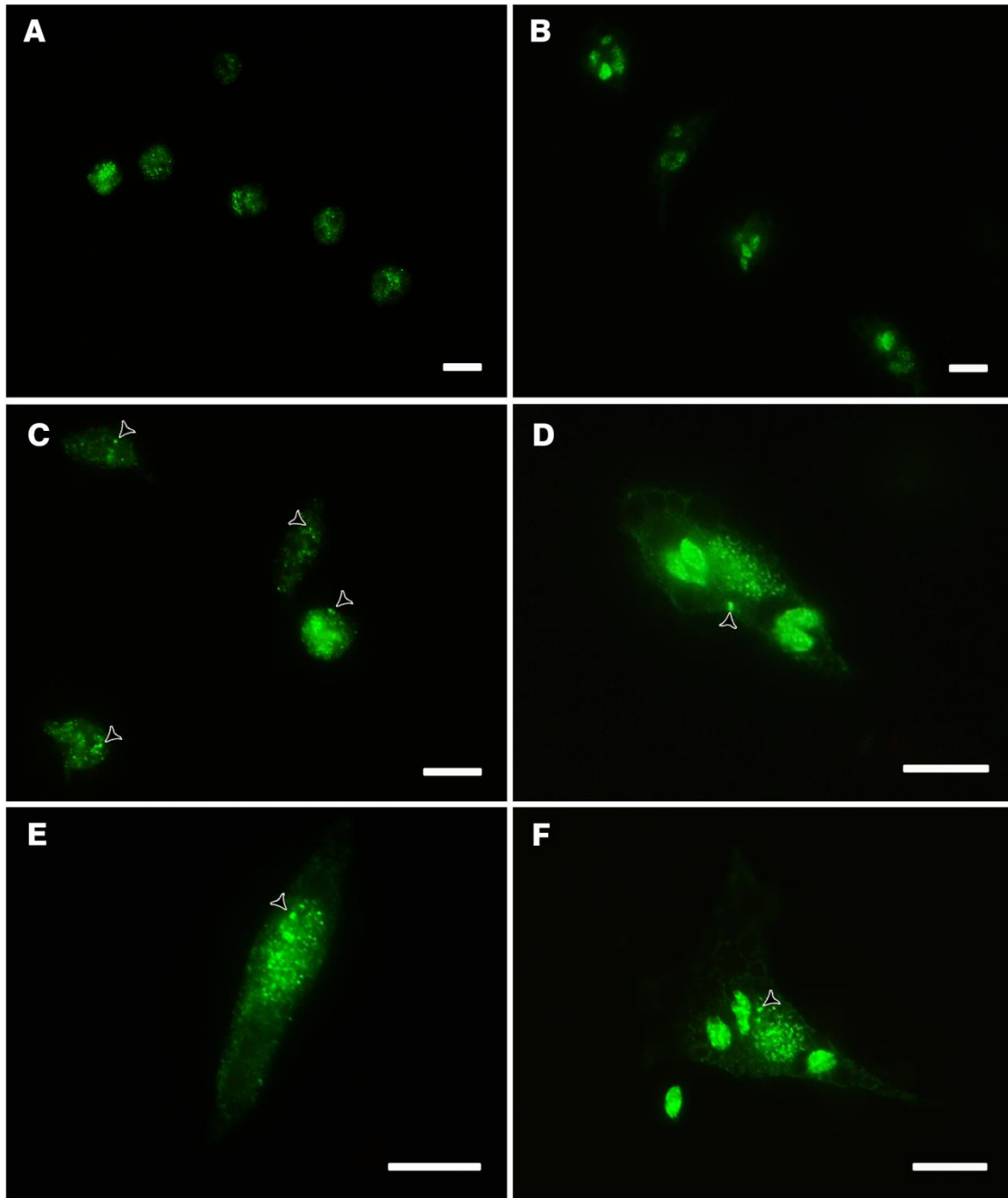
**Figura 4.13.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de macrófagos submetidas a estresse nutricional e infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 6 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma. Barras: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.14.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de macrófagos infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 24 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma. Barras: 10 μm.

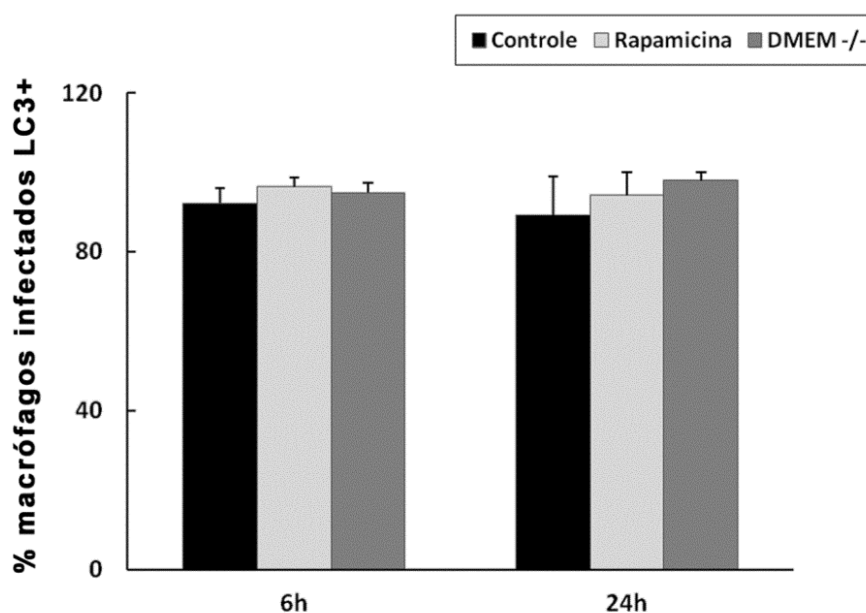


**Figura 4.15.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de macrófagos tratadas com rapamicina e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 24 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas e vermelhas indicam pontos de LC3 no citoplasma e parasitos vacuolizados, respectivamente. Barras: 10 μm.



**Figura 4.16.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de macrófagos submetidas a estresse nutricional e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 24 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma. Barras: 10  $\mu$ m.





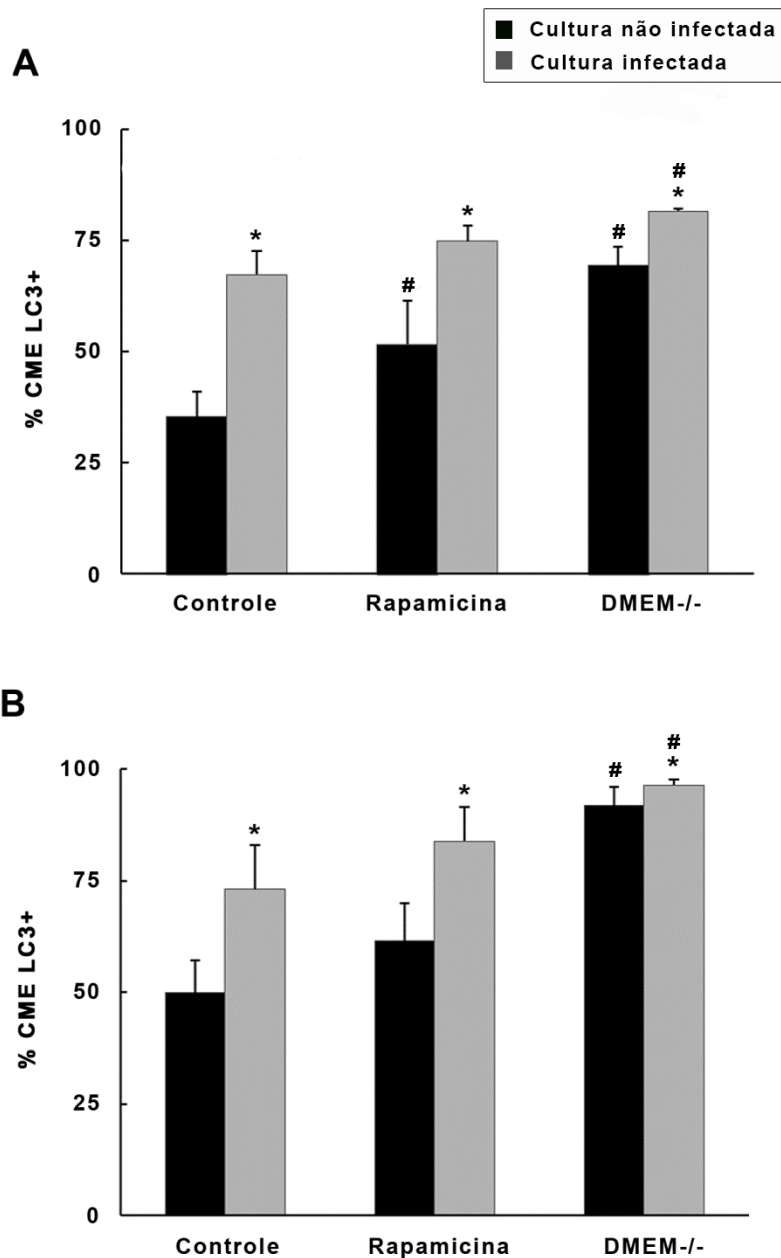
**Figura 4.17. Análise por imunofluorescência da expressão da proteína autofágica LC3 em macrófagos infectados de culturas submetidas ou não a estímulos autofágicos após 6 e 24 h de infecção.** Apenas os macrófagos infectados das culturas foram considerados na avaliação do número de células LC3+ nas diferentes condições e tempos. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 200 células/lamínula em duplicata. Foram utilizados como estímulos autofágicos a rapamicina e o estresse nutricional, sendo estes mantidos ao longo dos tempos avaliados.

#### 4.3.2. CME

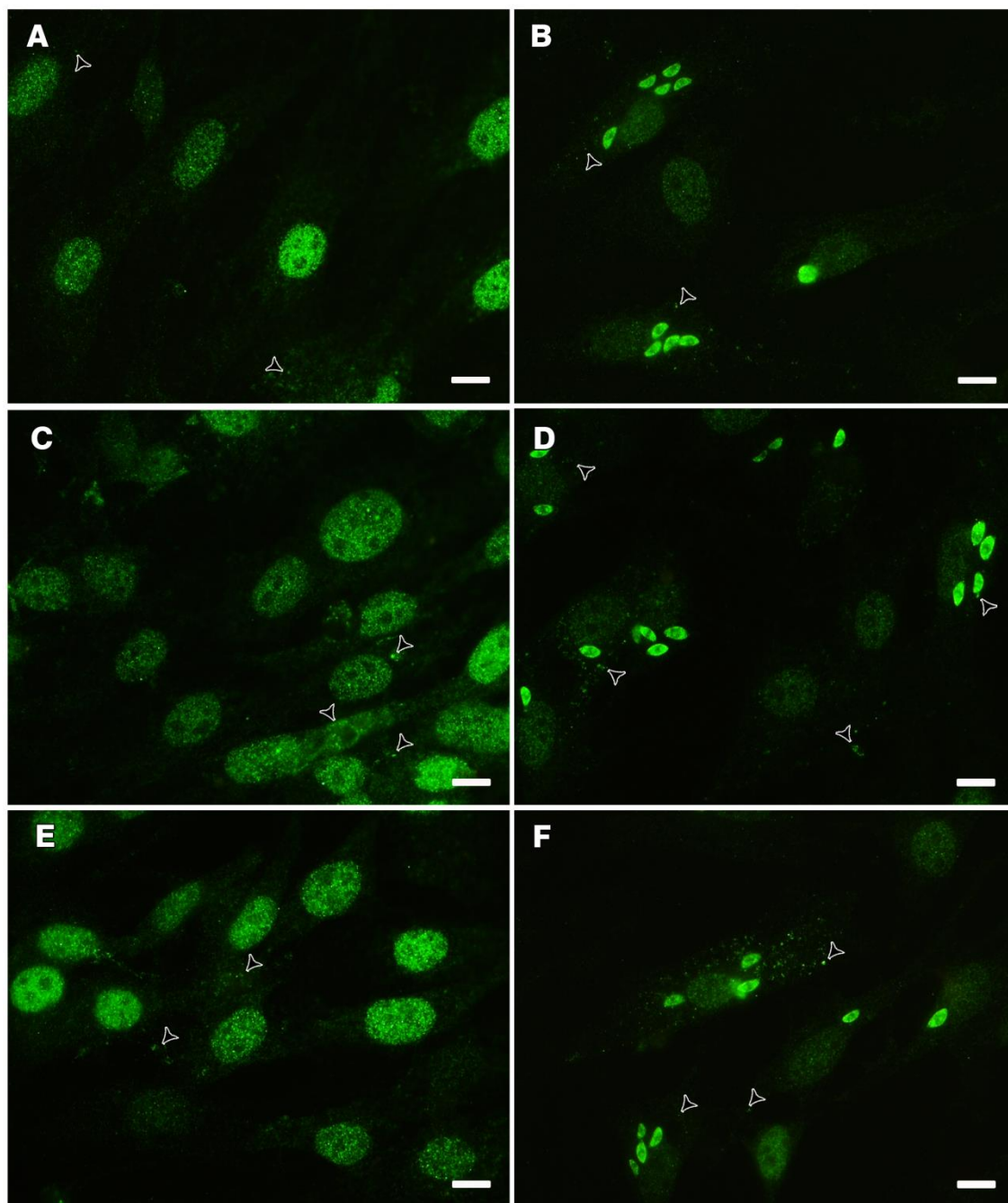
Diferentemente do observado em macrófagos, a infecção levou a um aumento no percentual de CME LC3+ em todos os grupos estudados em 6 e 24 h, atingindo percentuais de 50-90%, 40% e 5-20% no controle, rapamicina e DMEM-/-, respectivamente (**Figuras 4.18-4.24**). Foram observados também pontos de LC3 próximos ao parasito em todos os grupos experimentais (**Figuras 4.19D, 4.20D,F, 4.21B, 4.21D, 4.21F, 4.22F, 4.23B, 4.23D, 4.23F, 4.24D**). Rapamicina induziu a formação de vacúolos no parasito em 6 h de infecção (**Figura 4.20F**). Após 24 h, foram observados sinais de degradação do *T. gondii* em culturas de CME tratadas com essa droga (**Figura 4.23F**). A incubação com DMEM-/- induziu, nos dois tempos

de análise, um aumento significativo no percentual de CME LC3+ de cerca de 90% para culturas não infectadas e de 25% para infectadas (**Figura 4.18**). O tratamento com a rapamicina, por sua vez, induziu apenas em 6 h nas CME não infectadas um aumento de 50% no número de células LC3+ (**Figura 4.18A**).

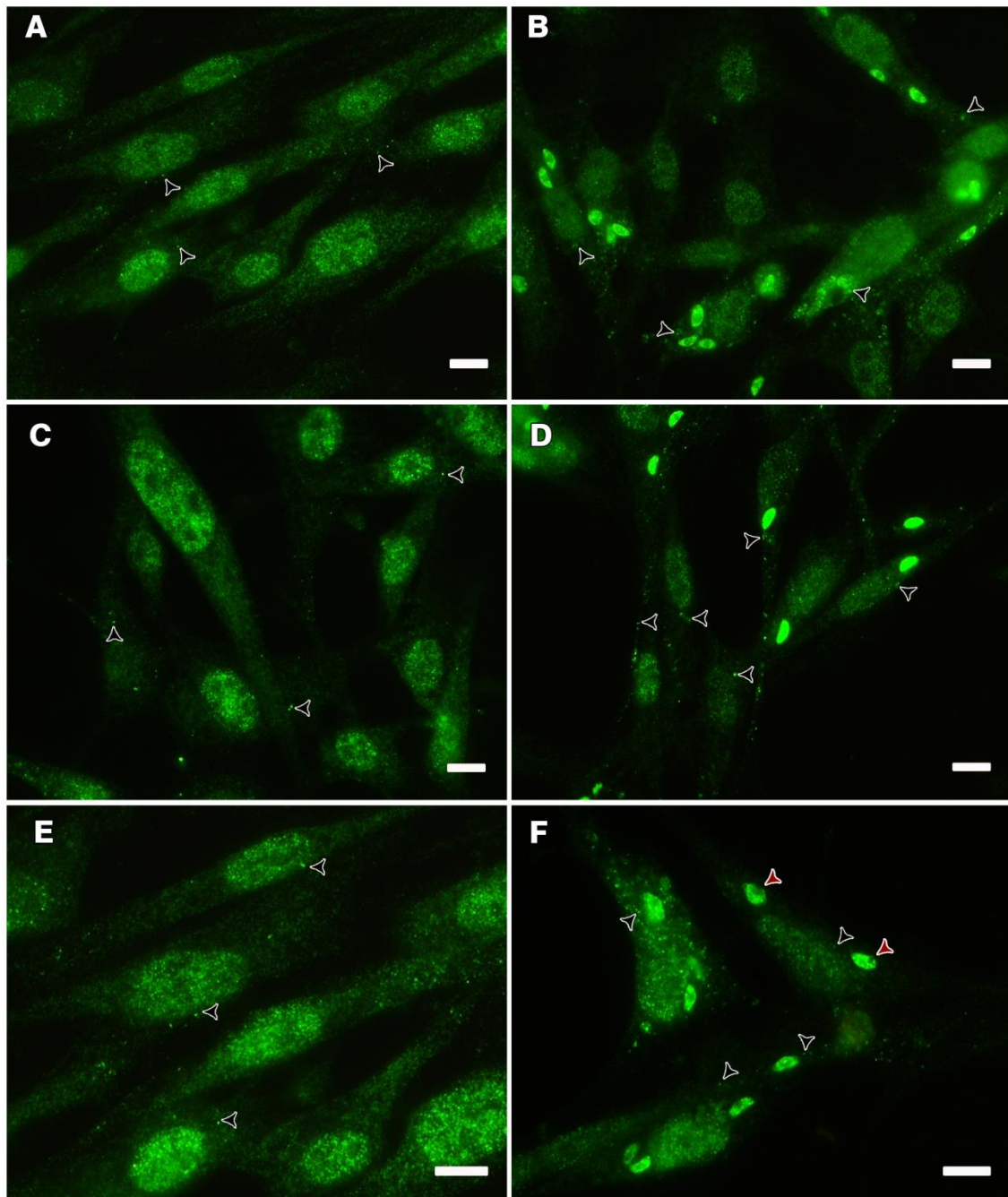
A análise de imunofluorescência apenas em macrófagos infectados mostrou que mais de 85% foram LC3+ independentemente do tratamento e do tempo de análise (**Figura 4.25**). Apenas as CME infectadas de culturas pré-incubadas com DMEM-/- apresentaram um discreto aumento no percentual de células LC3+ em relação às células controle em 6 h (98% x 85%).



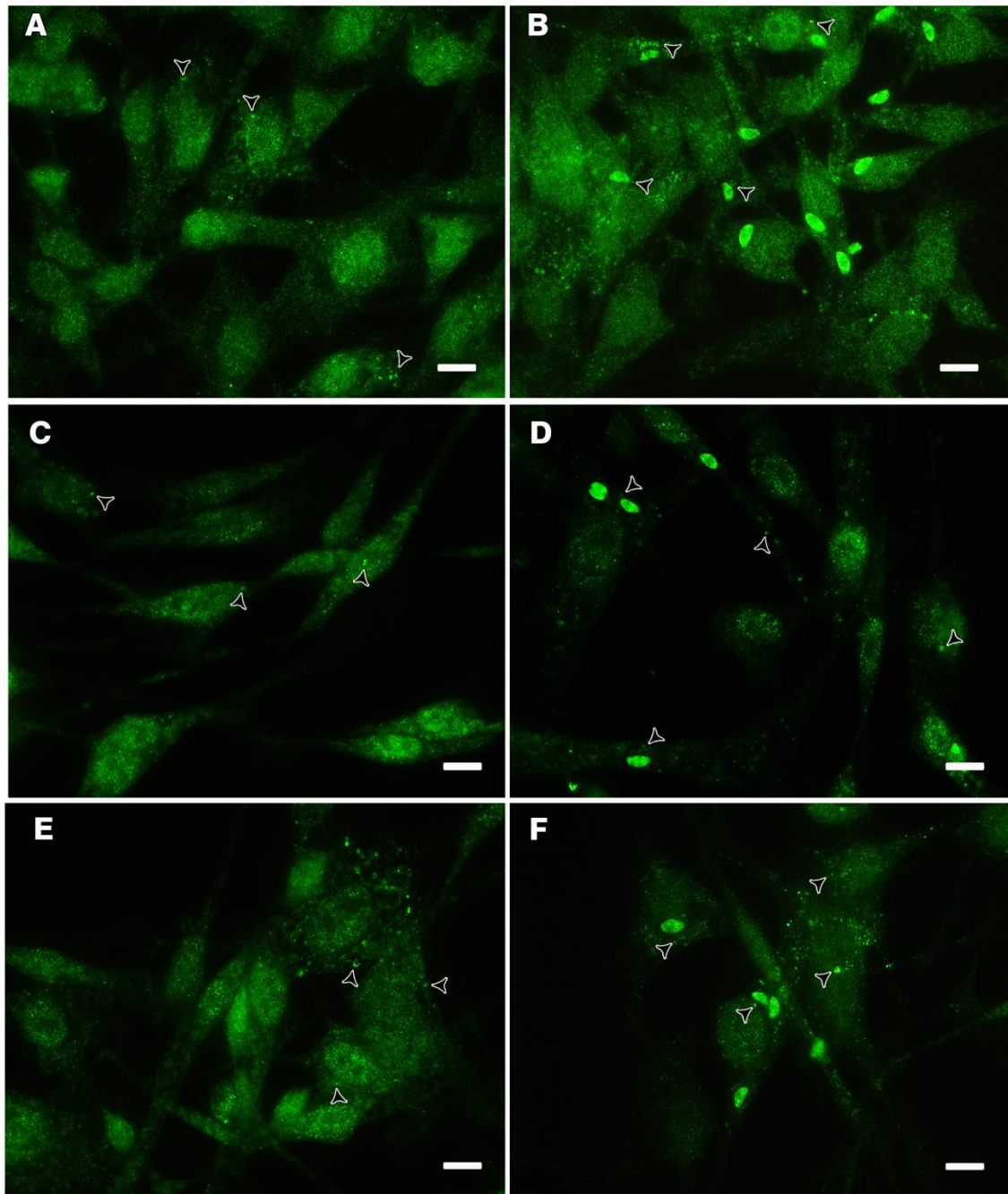
**Figura 4.18.** Análise por imunofluorescência da expressão da proteína autofágica LC3 em culturas de CME não infectadas (barra preta) e infectadas (barra cinza) e submetidas ou não a estímulos autofágicos. Foi avaliado o número de células LC3+ em 6 h (A) e 24 h (B) de infecção. Rapamicina e o estresse nutricional foram mantidos durante todo o experimento. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 200 células/lamínula em duplicata. Diferenças significativas são representadas por um asterisco para culturas não infectadas X infectadas, e jogo da velha, para culturas não tratadas X tratadas ( $p \leq 0,05$ ).



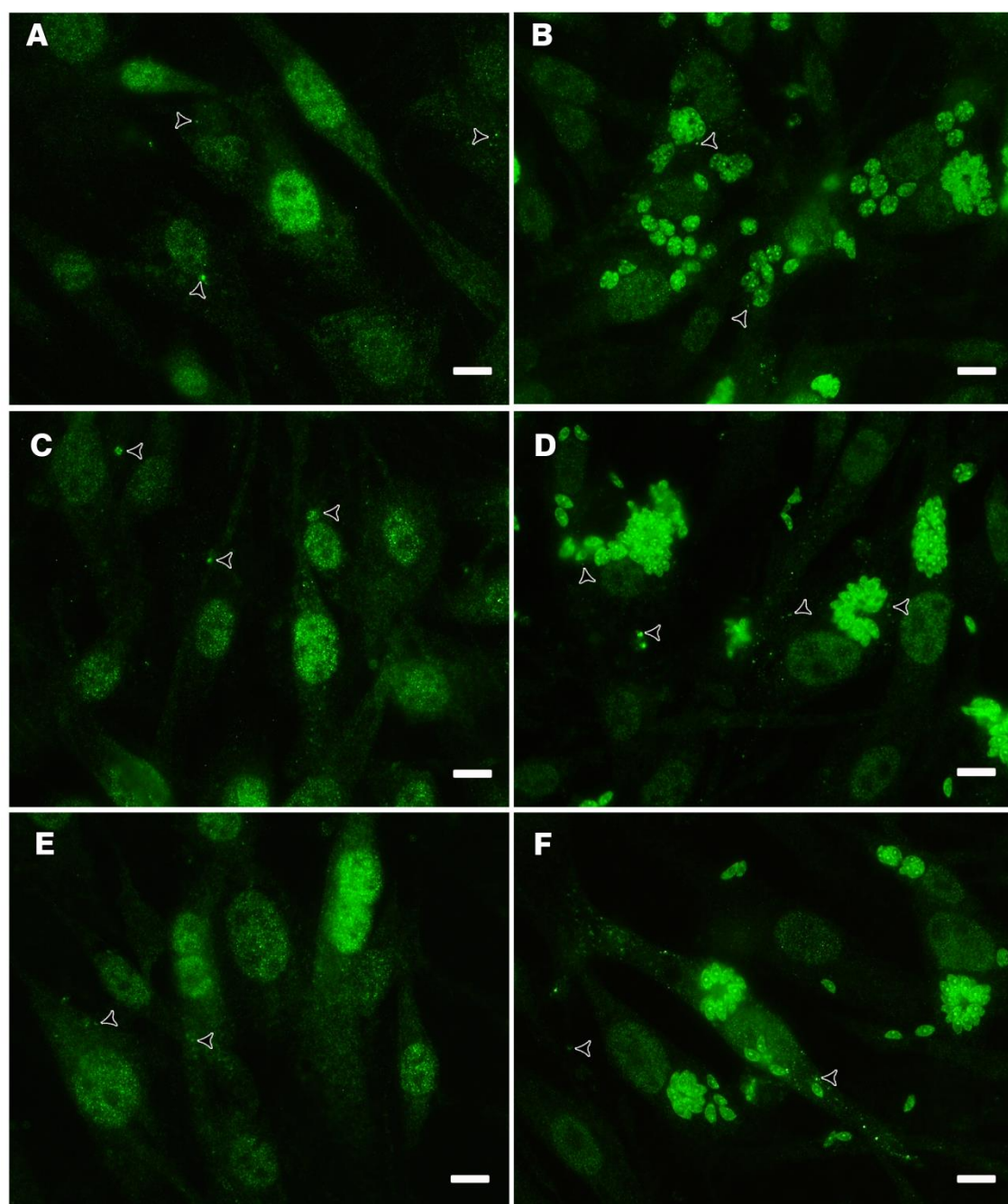
**Figura 4.19. Imunofluorescência para LC3 de culturas de CME infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 6 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma das CME. Barras: 10  $\mu$ m.**



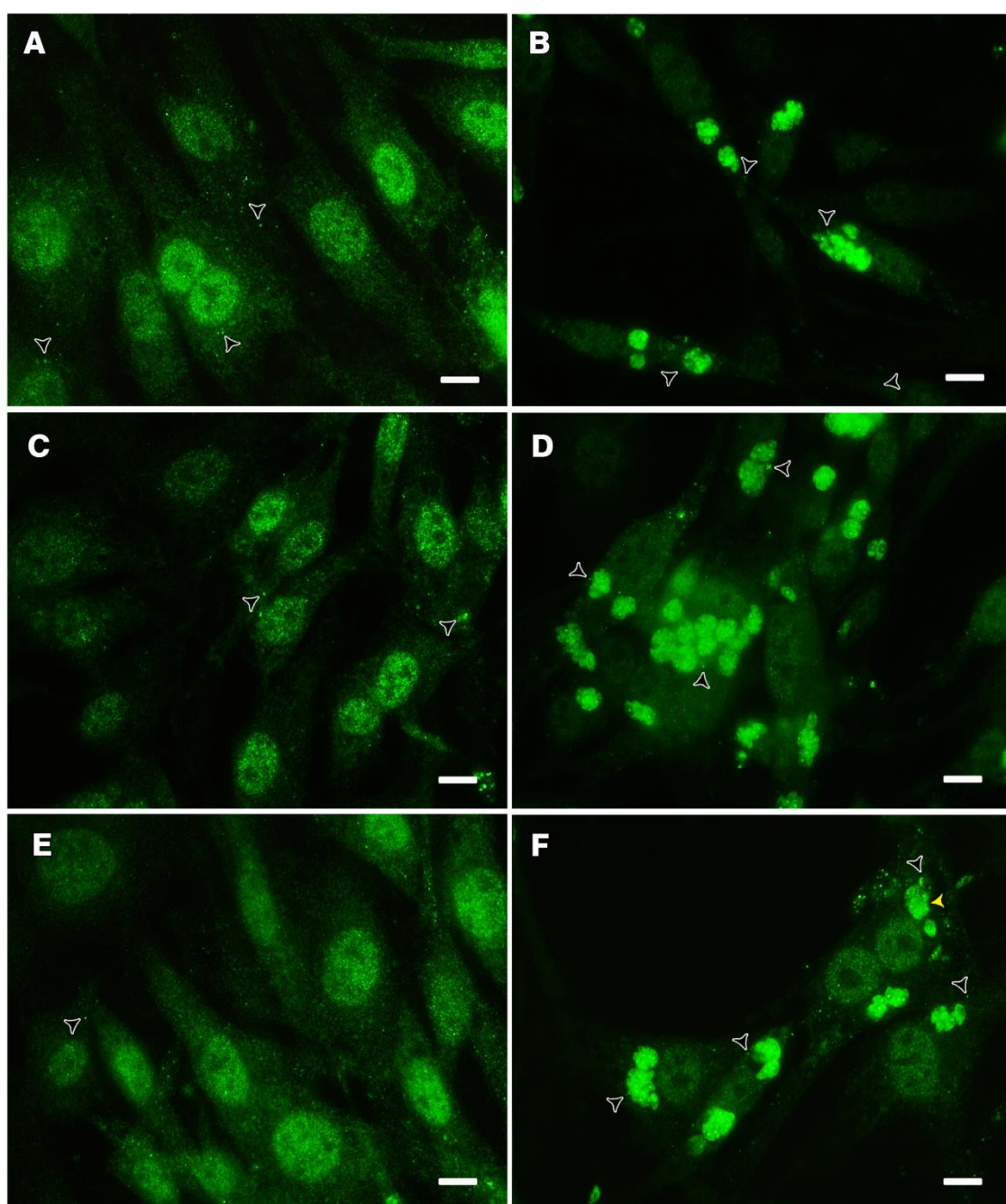
**Figura 4.20.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de CME tratadas com rapamicina e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 6 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas e vermelhas indicam pontos de LC3 no citoplasma das CME e parasitos vacuolizados, respectivamente. Barras: 10 μm.



**Figura 4.21. Imunofluorescência para LC3 de culturas de CME submetidas a estresse nutricional e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 6 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma das CME. Barras: 10  $\mu$ m.**

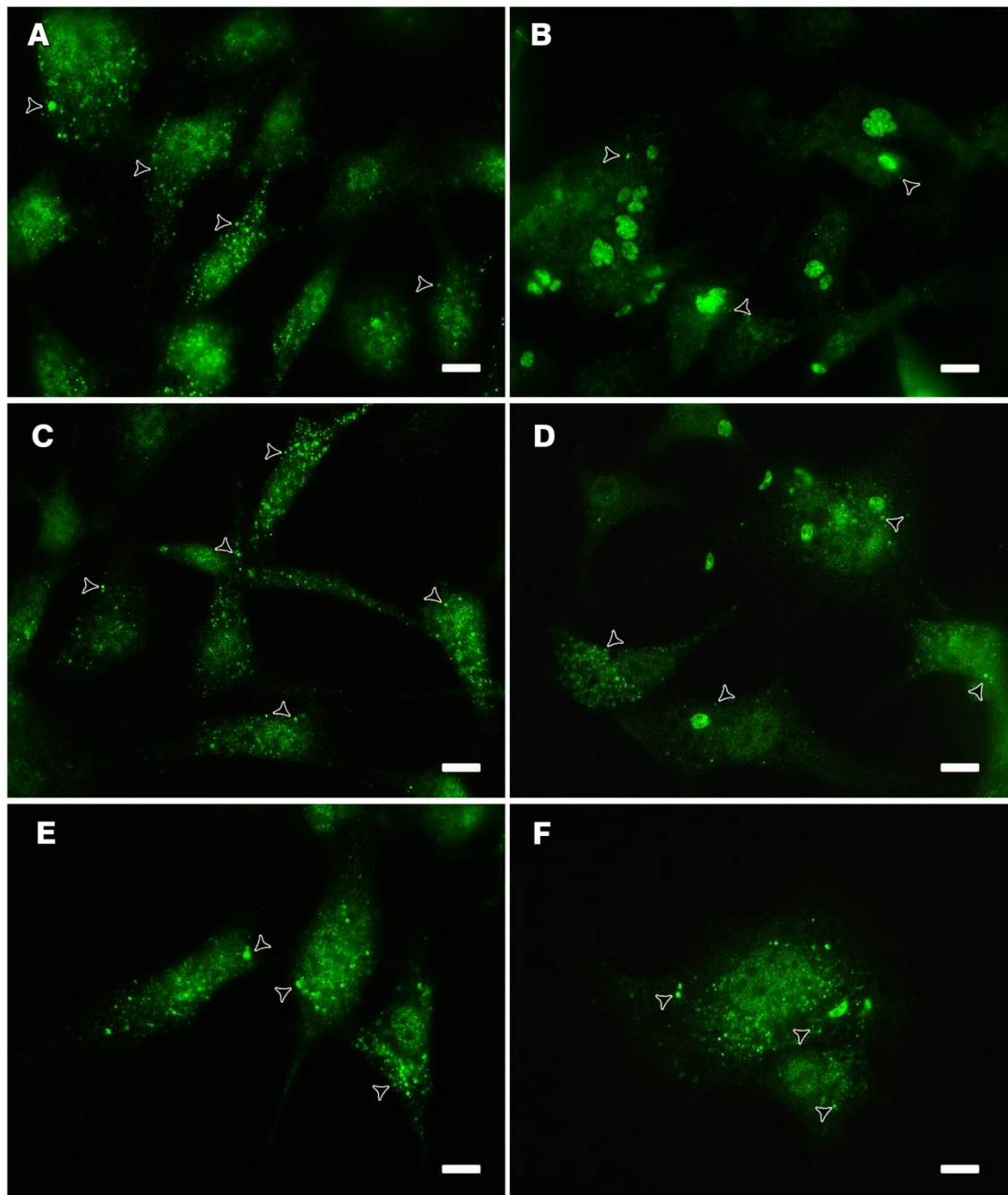


**Figura 4.22. Imunofluorescência para LC3 de culturas de CME infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 24 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma das CME. Barras: 10  $\mu$ m.**

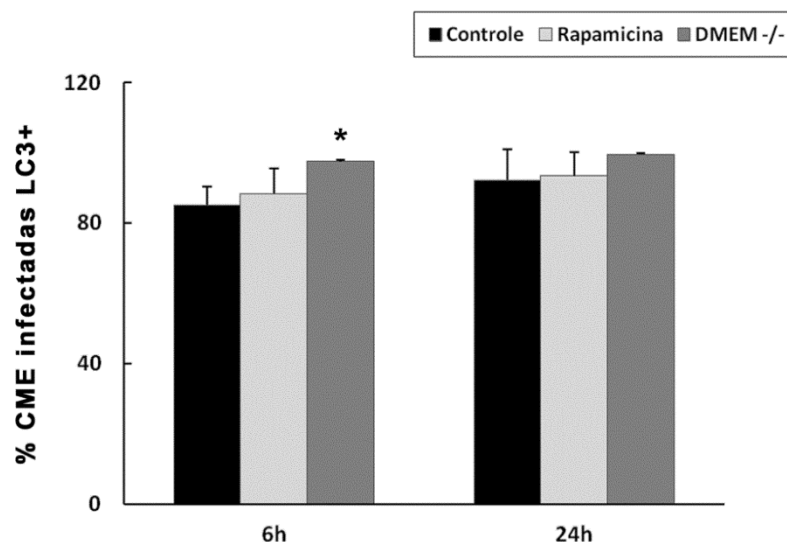


**Figura 4.23.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de CME incubadas com rapamicina e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* em 24 h. (A, C, E) Não infectadas. (B, D, F) Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma das CME. Cabeça de seta amarela indica parasitos degradados. Barras: 10  $\mu$ m.





**Figura 4.24.** Imunofluorescência para LC3 de culturas de CME submetidas a estresse nutricional e infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* no tempo de 24 h. **(A, C, E)** Não infectadas. **(B, D, F)** Infectadas. Cabeças de setas pretas indicam pontos de LC3 no citoplasma das CME. Barras: 10 μm.



**Figura 4.25. Análise por imunofluorescência da expressão da proteína autofágica LC3 em CME infectadas de culturas submetidas ou não a estímulos autofágicos após 6 e 24 h de infecção.** Apenas as CME infectadas das culturas foram consideradas na avaliação do número de células LC3+ nas diferentes condições e tempos. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes a partir da contagem de 200 células/lamínula em duplicata. Foram utilizados como estímulos autofágicos a rapamicina e o estresse nutricional, sendo estes mantidos ao longo dos tempos avaliados ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4. Caracterização ultraestrutural da autofagia na interação do *T. gondii* com macrófagos e CME

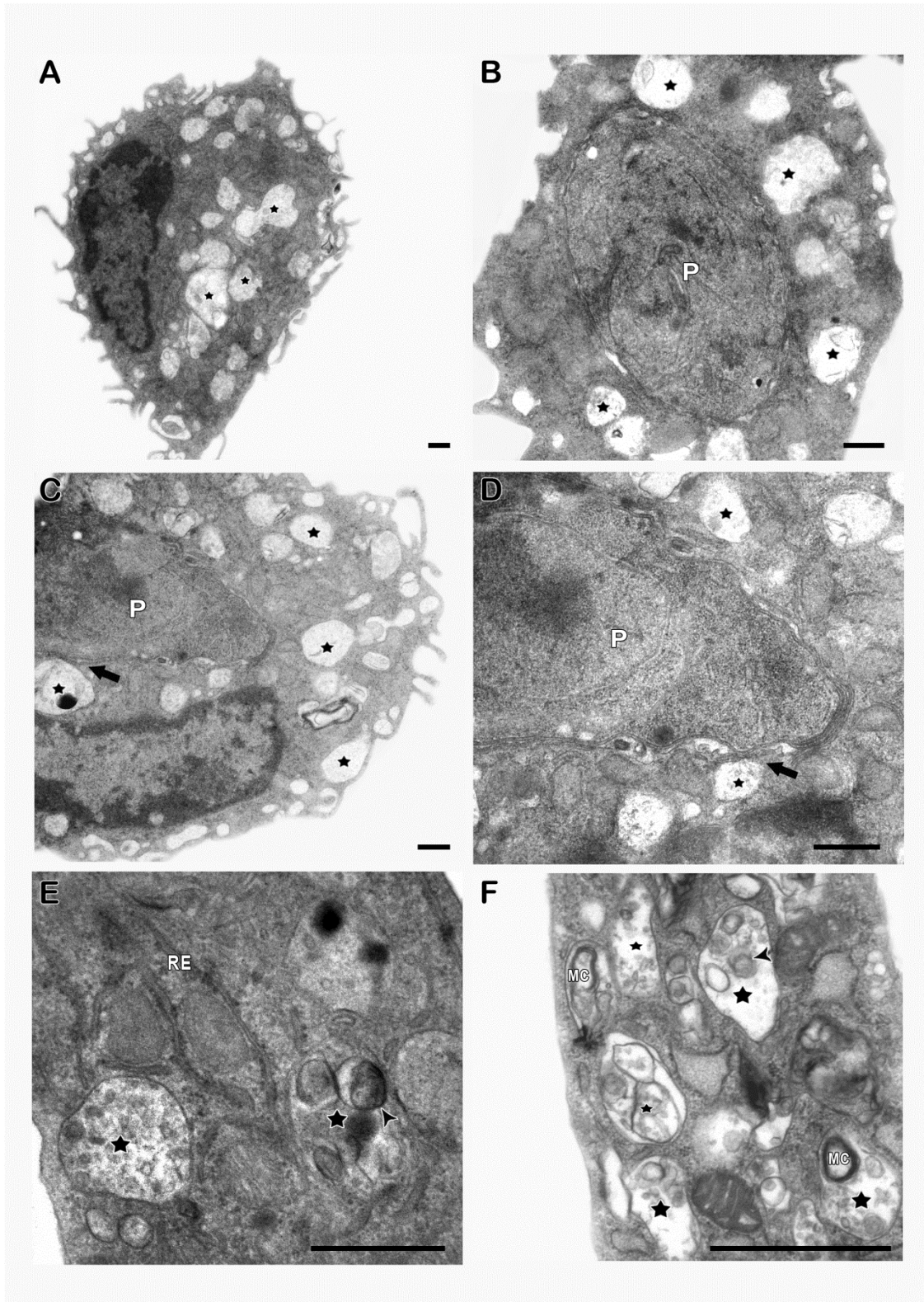
##### 4.4.1. Macrófagos

Em 6 e 24h, macrófagos infectados apresentaram vários autofagossomos tanto no controle quanto após o estímulo autofágico (**Figura 4.26-4.31**). Essas organelas, contendo material celular em diferentes estágios de degradação, como estruturas membranares concêntricas, foram observadas nas proximidades ou em íntimo contato com o vacúolo parasitóforo (**Figuras 4.26B-F, 4.27B-D, 4.28A-D, 4.29A-D, 4,29F, 4.30B-C, 4.31B**). Em 24 h, no entanto, rapamicina e o estresse nutricional induziram ainda o aparecimento de grandes autofagossomos, e em alguns casos, em íntima associação com mitocôndrias (**Figuras 4.30E, 4,30F; 4.31D-F**).

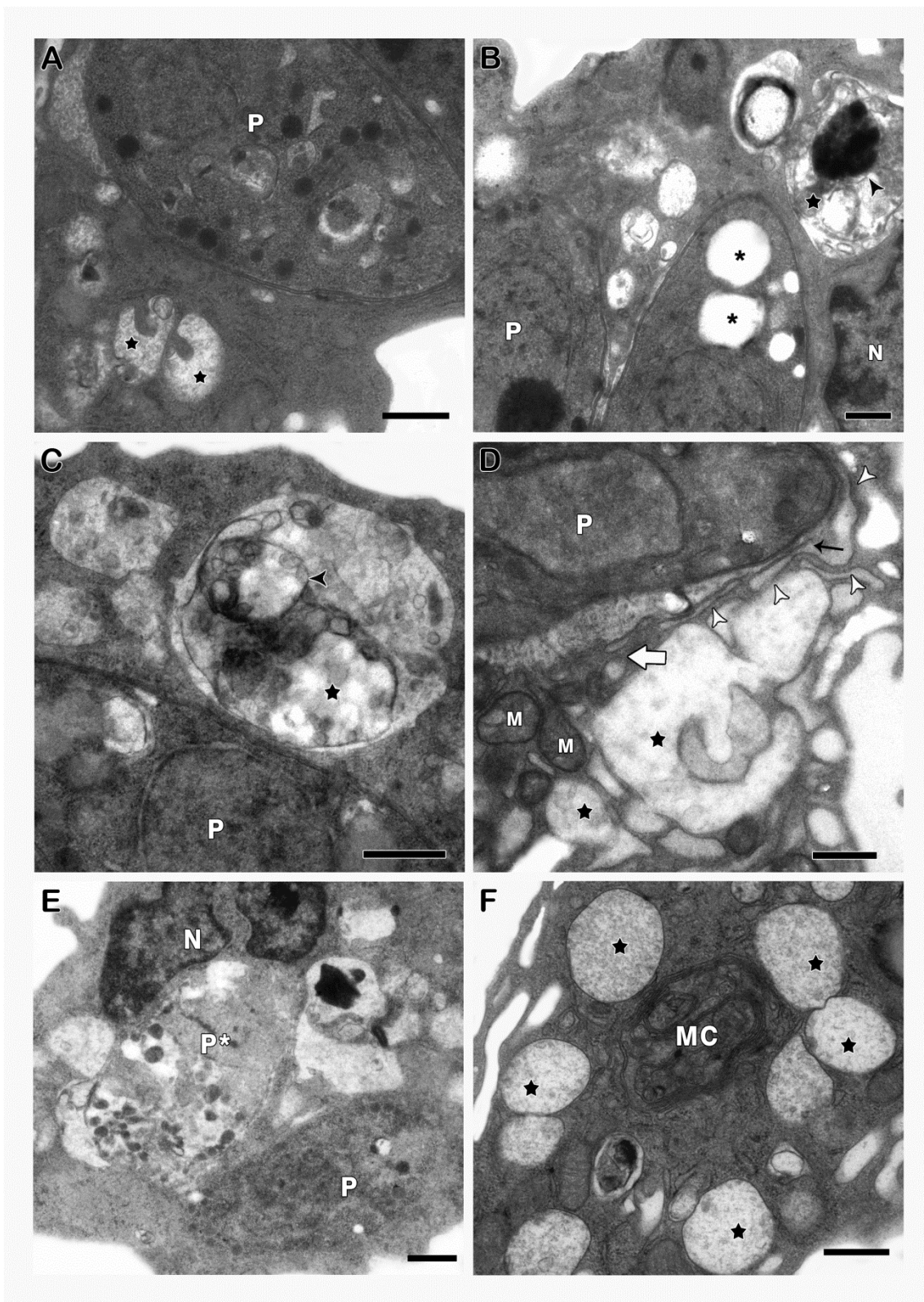
Em 6 h, células tratadas com rapamicina apresentaram perfis de retículo endoplasmático envolvendo a membrana do vacúolo parasitóforo, bem como regiões de infiltração de material celular no seu interior (**Figura 4.27D**). Ainda nessa condição, estruturas membranares concêntricas citoplasmáticas envoltas por autofagossomos também foram observadas (**Figura 4.27F**). Nas células submetidas a estresse nutricional, corpúsculos lipídicos foram encontrados no interior de autofagossomos em contato íntimo com o parasito (**Figura 4.28B**). Regiões de comunicação destas estruturas autofágicas com o vacúolo parasitóforo e com a película do parasito, cuja membrana plasmática mostrou desprendimento e dobra em determinadas regiões, também foram observadas (**Figura 4.28D**). O estresse nutricional ainda induziu o envolvimento de estruturas autofágicas por perfis de retículo endoplasmático (**Figura 4.28F**). Particularmente em 24 h, células submetidas ao estresse nutricional apresentaram parasitos no interior de vacúolos parasitóforos com membrana desestabilizada (aspecto ondulado) circundada por perfis de retículo endoplasmático (**Figura 4.31B**). Adicionalmente, no interior desses vacúolos também foram observadas estruturas membranares concêntricas e uma rede túbulo vesicular bastante desenvolvida (**Figura 4.31B**).

Em ambos os tempos, apenas taquizoítos com morfologia típica foram observados no controle (**Figuras 4.26B-D, 4.29**), ao contrário dos grupos tratados com rapamicina ou submetidos a estresse nutricional. Em 6 e 24 h, macrófagos tratados com rapamicina apresentaram, além de parasitos íntegros, parasitos contendo autofagossomos e/ou estruturas membranares concêntricas em seu citoplasma (**Figuras 4.27B, 4.30B**). Parasitos em processo avançado de degradação no interior de estruturas autofágicas também foram detectados em macrófagos submetidos aos dois estímulos autofágicos (**Figuras 4.27E, 4.28E, 4.30D**).

**Figura 4.26. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos 6 h após a infecção com *T. gondii*.** (A) Macrófago não parasitado apresentando inúmeros autofagossomos (estrelas pretas). (B-D) Taquizoítos (P) com morfologia típica e nas proximidades do vacúolo parasitóforo vários autofagossomos (estrelas pretas) são vistos, em alguns casos apresentando íntimo contato o vacúolo (seta preta larga). (E, F) Ampla distribuição de autofagossomos (estrelas pretas), contendo material celular (cabeças de seta pretas) em diferentes estágios de degradação, incluindo estruturas membranares concêntricas (MC) em seu interior. RE: retículo endoplasmático. Barras: 0,5  $\mu$ m

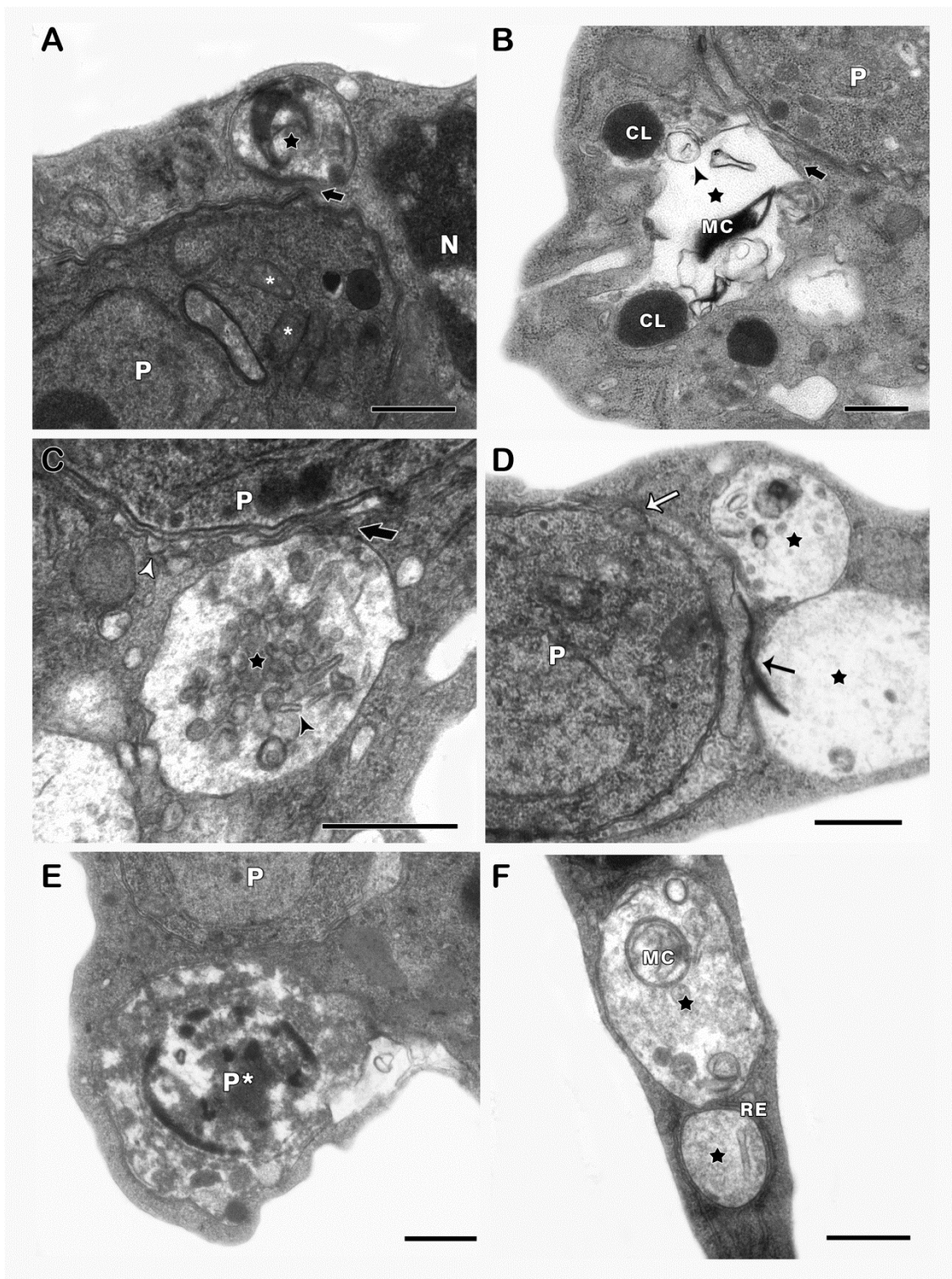


**Figura 4.27. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos pré-tratadas com rapamicina, 6 h após a infecção com *T. gondii*.** Taquizoítos (P) de morfologia típica (**A**) ou contendo autofagossomos (asterisco preto) (**B**). Autofagossomos (estrelas pretas) e mitocôndrias (M) em íntimo contato com o vacúolo parasitóforo (**B-D**). Perfis de retículo endoplasmático (cabeça de seta branca) circundando a membrana do vacúolo parasitóforo (seta preta). Infiltração de material celular para o interior do vacúolo parasitóforo (seta larga branca) (**D**). Parasito em processo avançado de degradação no interior de um autofagossomo (P\*) (**E**). (**F**) Autofagossomos (estrelas pretas) circundando estrutura membranar concêntrica (MC). N: Núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5  $\mu$ m

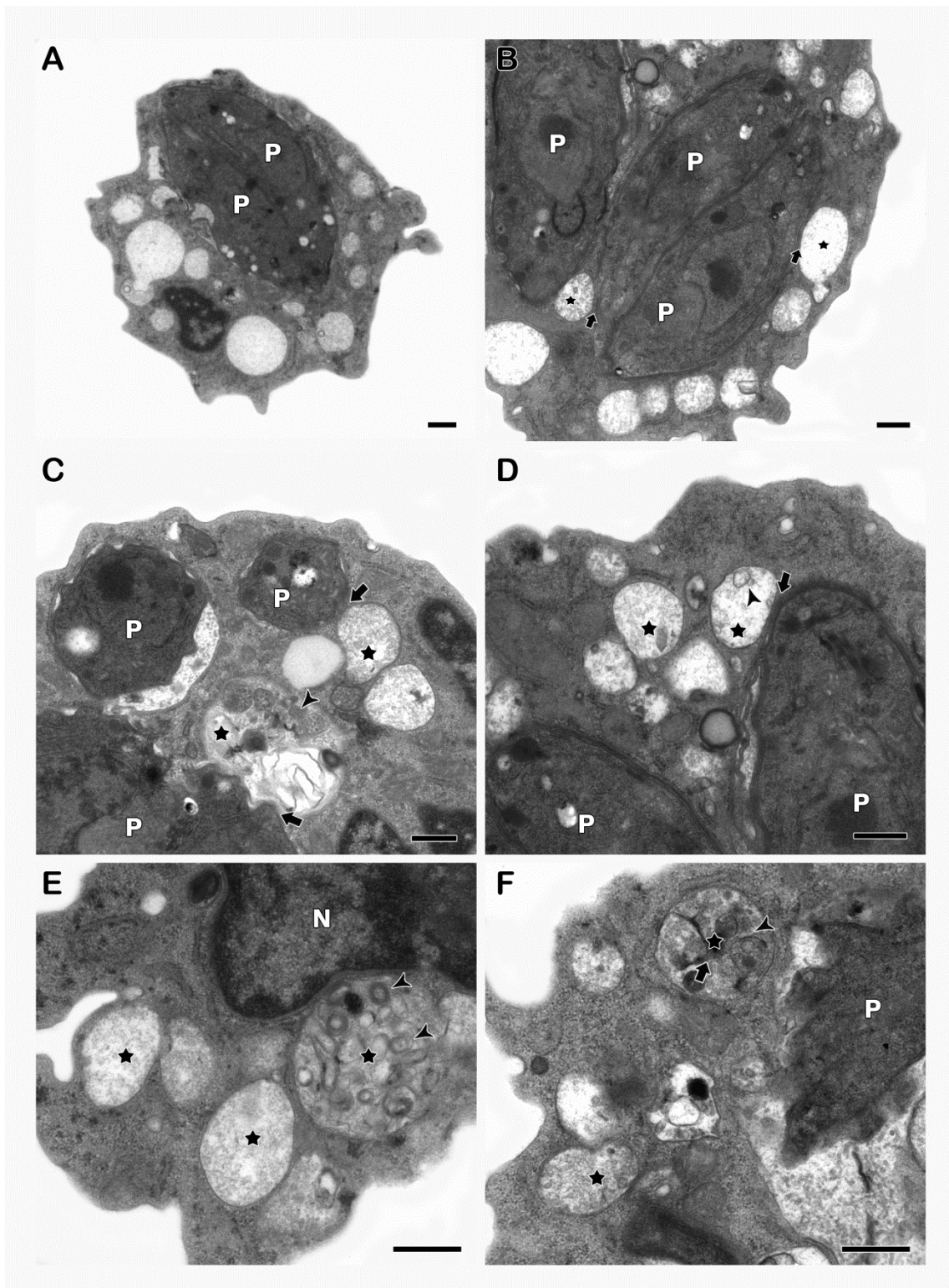


**Figura 4.28. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos pré-incubadas em DMEM-/-, 6 h após a infecção com *T. gondii*.** (A-C) Vacúolo parasitóforo contendo taquizoíta (P) íntegro em íntima associação (setas largas pretas) com autofagossomos (estrelas pretas) contendo corpúsculos lipídicos (CL), estrutura membranar concêntrica (MC) e outros componentes celulares (cabeças de setas pretas) em diferentes estágios de degradação. (C) Membrana do vacúolo parasitóforo com aspecto ondulado (cabeça de seta branca) e do autofagossomo são vistos em estreito contato. (D) Dois autofagossomos da célula hospedeira (estrela preta) associados ao vacúolo parasitóforo, contendo membrana eletrodensa (seta preta) em comunicação com este. Seta branca indica desprendimento e dobra da membrana plasmática do taquizoíta (P). (E) Parasito no interior de um autofagossomo (P\*) em estágio final de degradação. (F) Detalhe de autofagossomos (estrelas pretas) contendo estrutura membranar concêntrica (MC) e sua interação com o retículo endoplasmático (RE). Barras: 0,5  $\mu\text{m}$

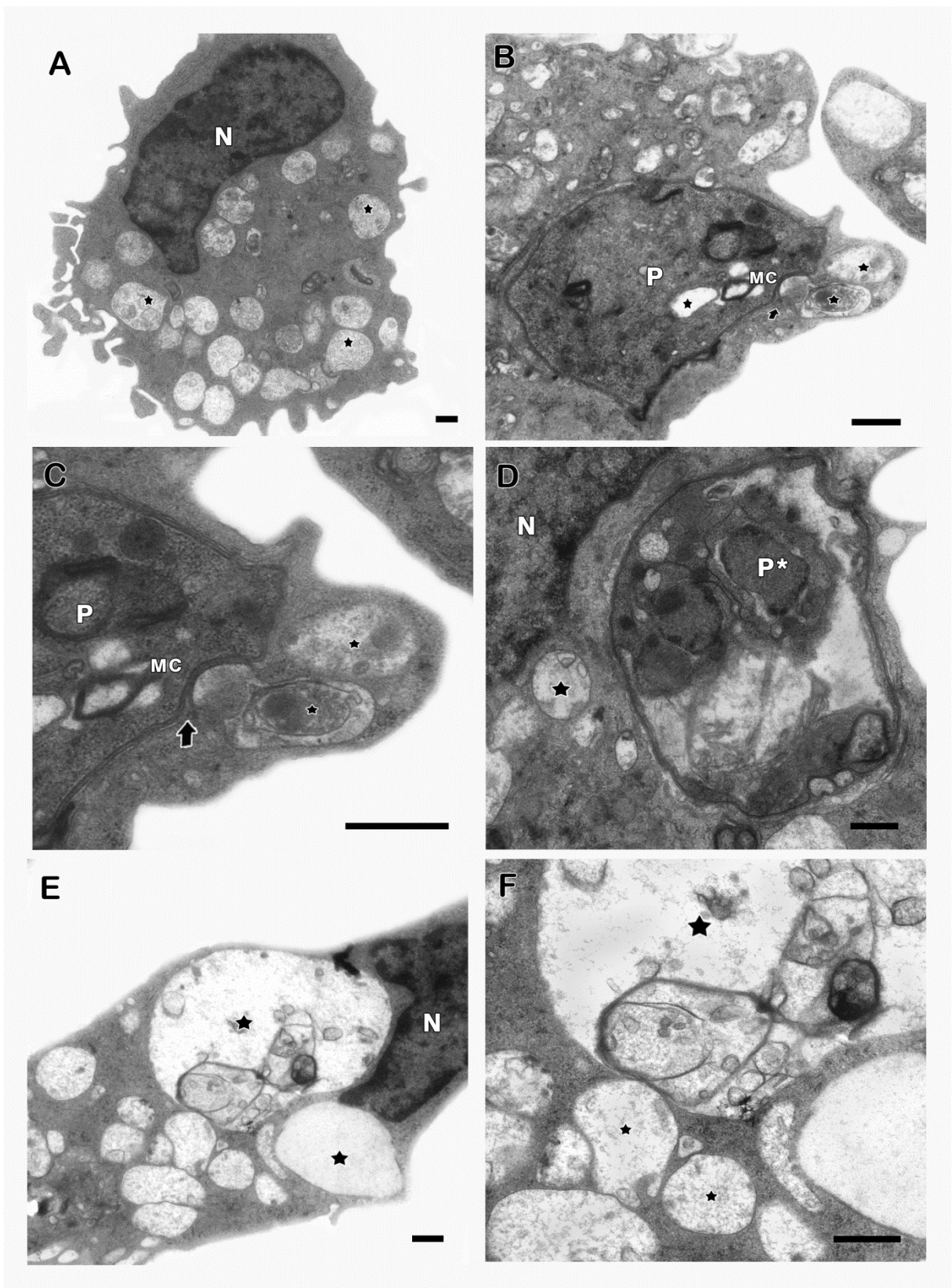




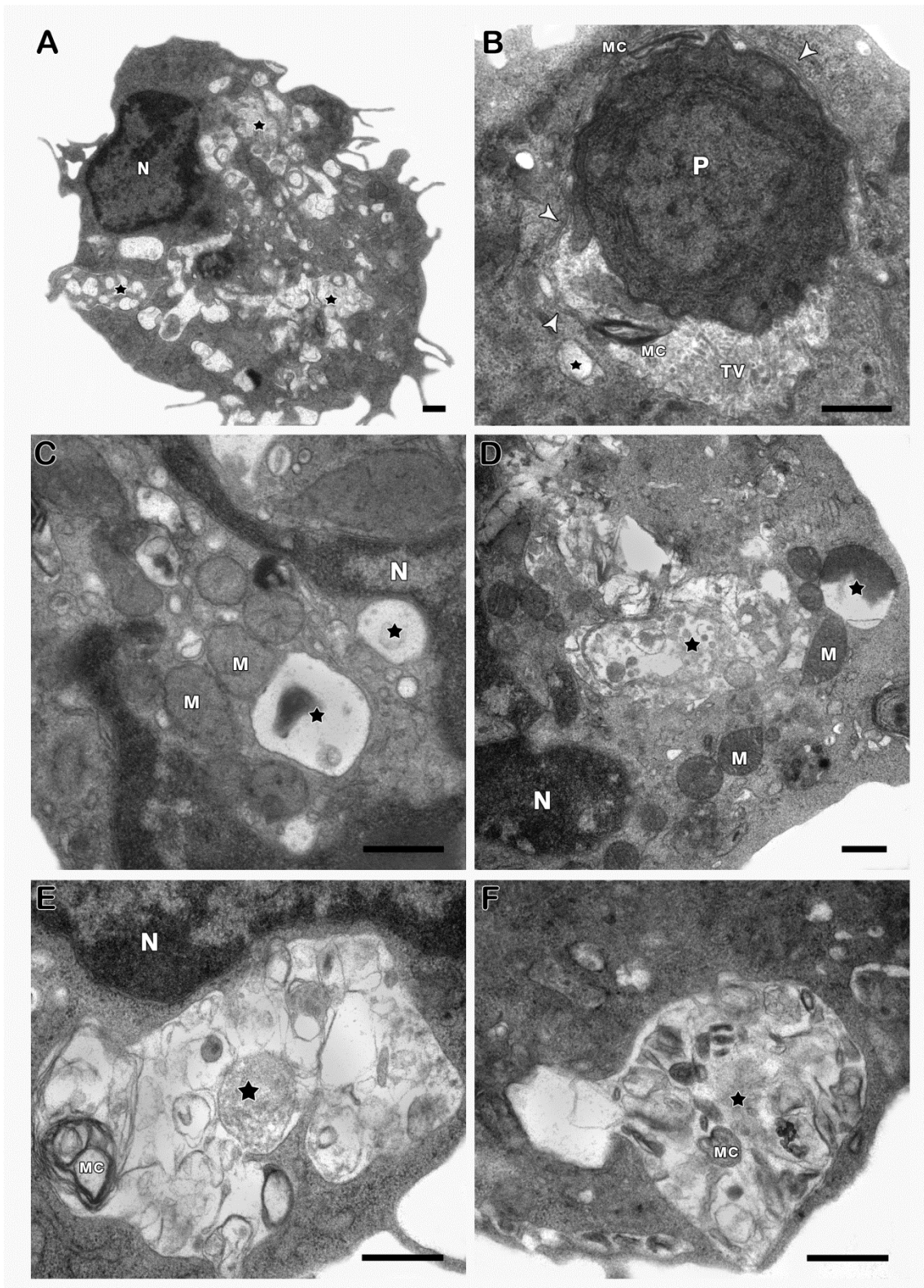
**Figura 4.29. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos, 24 h após a infecção com *T. gondii*. (A-F) Taquizoítos (P) com morfologia característica foram observados em íntimo contato (setas largas pretas) com autofagossomos (estrelas pretas) contendo material em diferentes estágios de degradação (cabeças de seta pretas). N: núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5  $\mu$ m**



**Figura 4.30. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos pré-tratadas com rapamicina, 24 h após a infecção com *T. gondii*. (A) Macrófagos com inúmeros autofagossomos (estrelas pretas). (B, C) Taquizoíto (P) apresentando autofagossomo e estrutura membranar concêntrica (MC) em seu citoplasma. Íntimo contato (seta larga preta) entre autofagossomos (estrelas pretas) e o parasito. (D) Parasito degradado no interior de um autofagossomo (P\*). (E, F) Detalhe da formação de grandes autofagossomos (estrelas pretas) no citoplasma dos macrófagos. N: núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5  $\mu$ m**



**Figura 4.31. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos pré-incubados em DMEM-/-, 24 h após a infecção com *T. gondii*.** (A) Macrófago com múltiplos autofagossomos (estrelas pretas). (B) Taquizoíto (P) íntegro no interior de um vacúolo parasitóforo com membrana desestabilizada (aspecto ondulado) apresentando perfis de retículo endoplasmático (cabeças de setas brancas) em diversos pontos. Formação de membranas concêntricas (setas pretas) e aumento da rede túbulo vesicular (TV) no interior do vacúolo parasitóforo. (C-F) Grandes autofagossomos (estrelas pretas) em íntimo contato com mitocôndrias (M) contendo material em diversos estágios de degradação como estruturas membranares concêntricas (MC). N: núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5  $\mu\text{m}$



#### 4.4.2. CME

Dentre os fenótipos mais recorrentes observados em CME após 6 e 24 h de infecção no controle, rapamicina e DMEM/-, destaca-se o aparecimento de vários autofagossomos (**Figuras 4.32-4.38**) contendo material em diferentes estágios de degradação, como estruturas membranares concêntricas nas proximidades ou em íntimo contato com a membrana do vacúolo parasitóforo (**Figuras 4.32C-E, 4.33A-C, 4.34B, 4.35D-F, 4.36A-C,E, 4.37A-C, 4.38**). Em paralelo, várias mitocôndrias circundando o vacúolo parasitóforo também puderam ser observadas (**Figuras 4.32C, D, 4.33B, 4.34C, 4.35C, 4.36C, D, 4.38C, F**). Em 24 h, grandes autofagossomos foram detectados após a indução de autofagia (rapamicina e DMEM/-), sendo em alguns casos observada uma íntima associação destas organelas com mitocôndrias e complexo de Golgi (**Figuras 4.36D, 4.37A, 4.38F**).

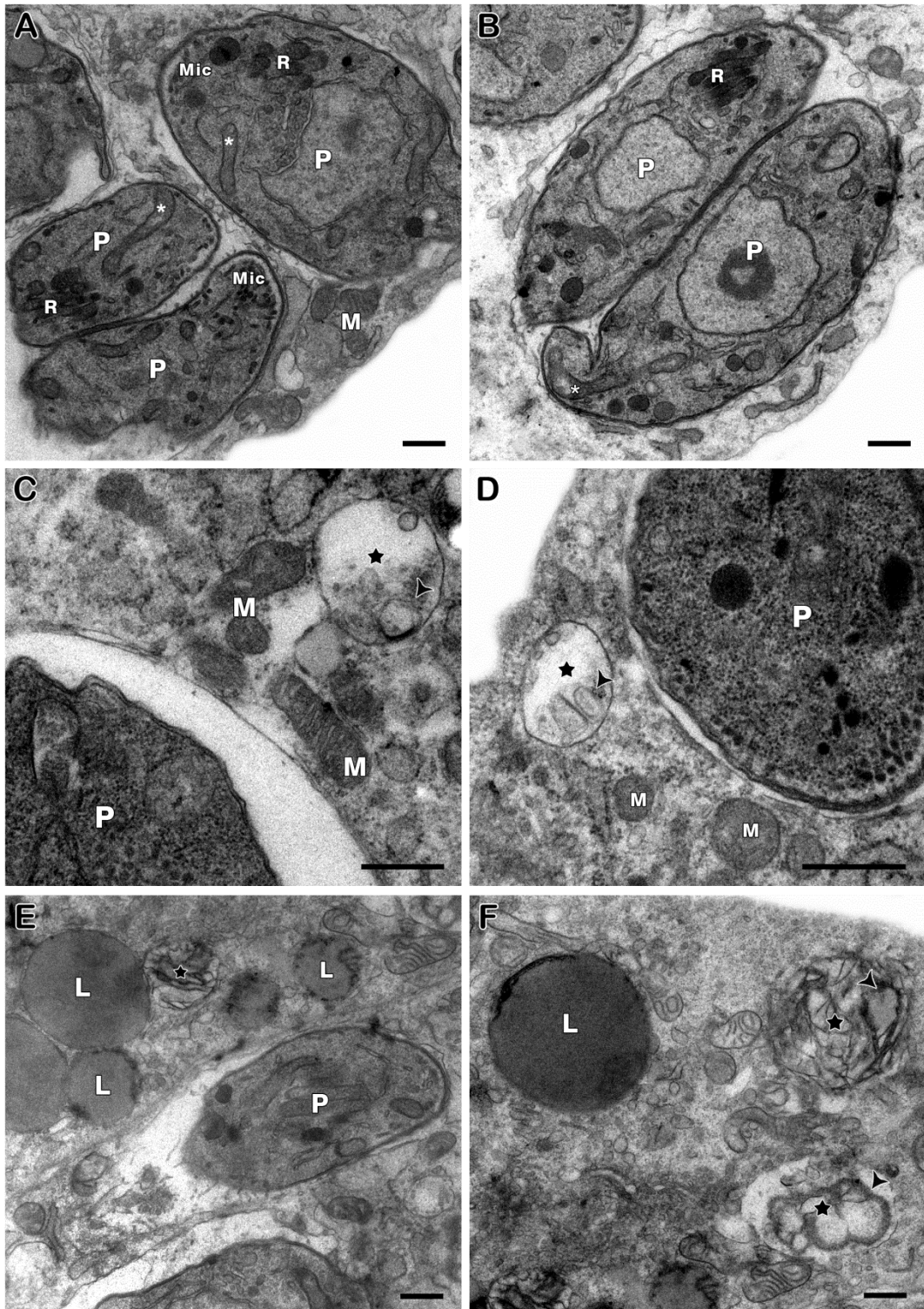
Em 6 h, o tratamento com rapamicina e a incubação em DMEM/- levou ao aparecimento de corpúsculos lipídicos em processo de degradação. Estas estruturas foram encontradas no interior de vacúolos autofágicos próximos ao parasito (**Figuras 4.33E, 4.34F**). Nesse tempo, foram observados corpúsculos lipídicos intactos no controle (**Figuras 4.32E, F**). Rapamicina ainda induziu o inchaço das cisternas de Golgi (**Figura 4.33F**), enquanto nas células submetidas a estresse nutricional, perfis de retículo endoplasmático foram encontrados envolvendo estruturas autofágicas (**Figura 4.34E**).

Em 6 e 24 h, a desestabilização da membrana do vacúolo parasitóforo também foi observada tanto para CME tratadas com rapamicina (**Figuras 4.33B, 4.36C**) quanto para as submetidas a estresse nutricional (**Figuras 4.34C, 4.38D**). No tempo mais curto, o tratamento com rapamicina levou à infiltração de conteúdo citoplasmático para o interior do vacúolo parasitóforo (**Figura 4.33B**). Já nas células submetidas a estresse nutricional, membrana eletrondensa, frequentemente observada em autofagossomos, foi encontrada envolvendo esses vacúolos (**Figura 4.34C**). Em 24 h, essa mesma condição levou a um evento morfológico indicativo de fusão do vacúolo parasitóforo com os autofagossomos (**Figura 4.38C**). Ainda nesse tempo, CME tratadas com rapamicina apresentaram estruturas sugestivas de grandes fagóforos com membrana de alta eletrondensidade envolvendo taquizoítos no citoplasma das CME (**Figuras 4.37A-C**).

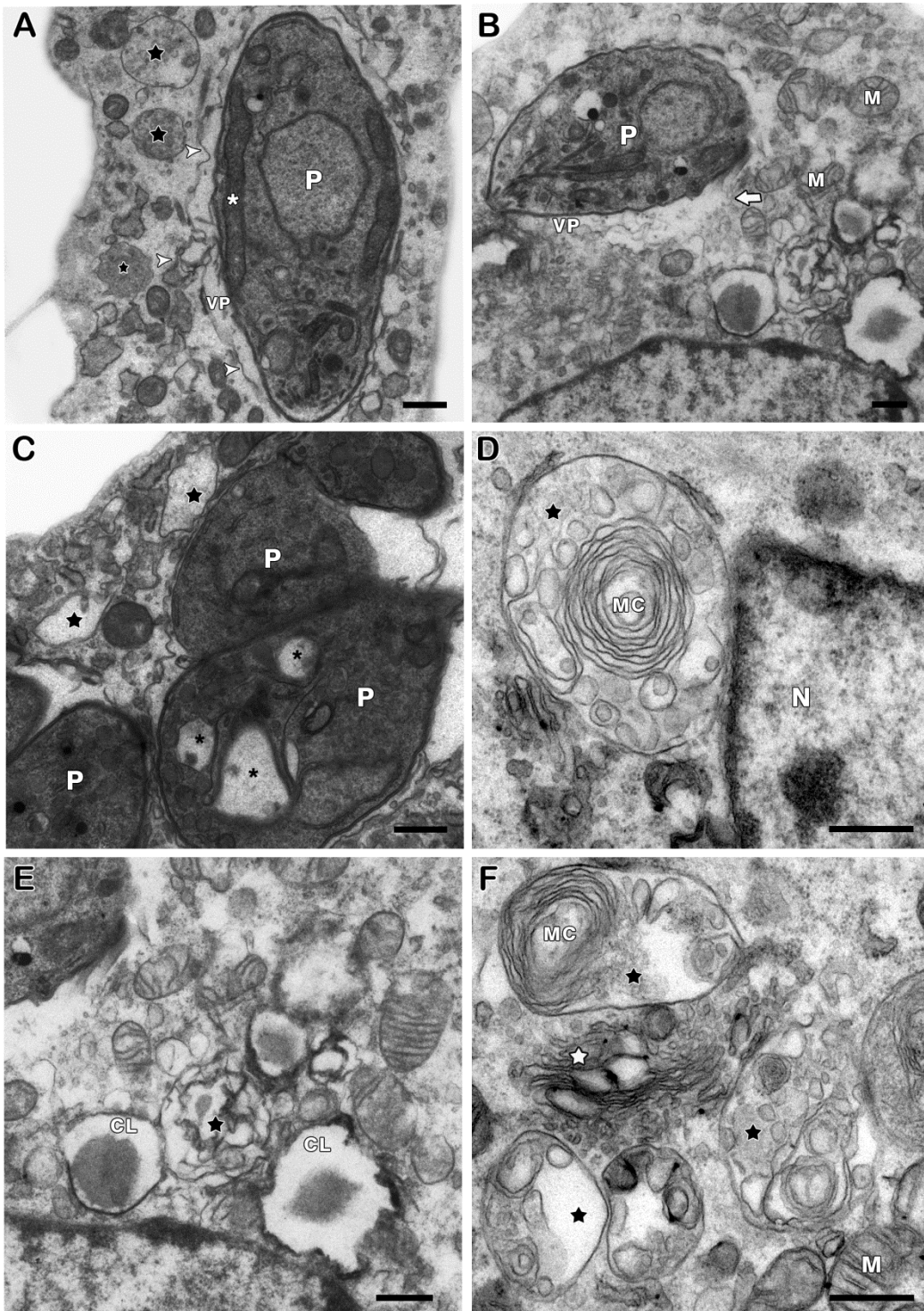


Em ambos os tempos, apenas taquizoítos de morfologia normal foram observados no controle (**Figuras 4.32A-D, 4.35A-F**), ao contrário das células tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional em que foram encontrados tanto parasitos íntegros (**Figuras 4.33A, B 4.34A-C, 4.36A, 4.38B**) quanto parasitos contendo autofagossomos (**Figuras 4.33C, 4.34D, 4.36C, 4.38D**). Apenas em 24 h, estruturas sugestivas de parasitos em processo final de degradação foram observadas em CME tratadas com rapamicina (**Figuras 4.36D, 4.37D**) e submetidas ao estresse nutricional (**Figura 4.38E**). Ainda nesse tempo, rapamicina levou à formação de autofagossomos e estruturas membranares concêntricas no interior de corpos residuais, procedentes do processo de endodiogenia. (**Figura 4.36F**).

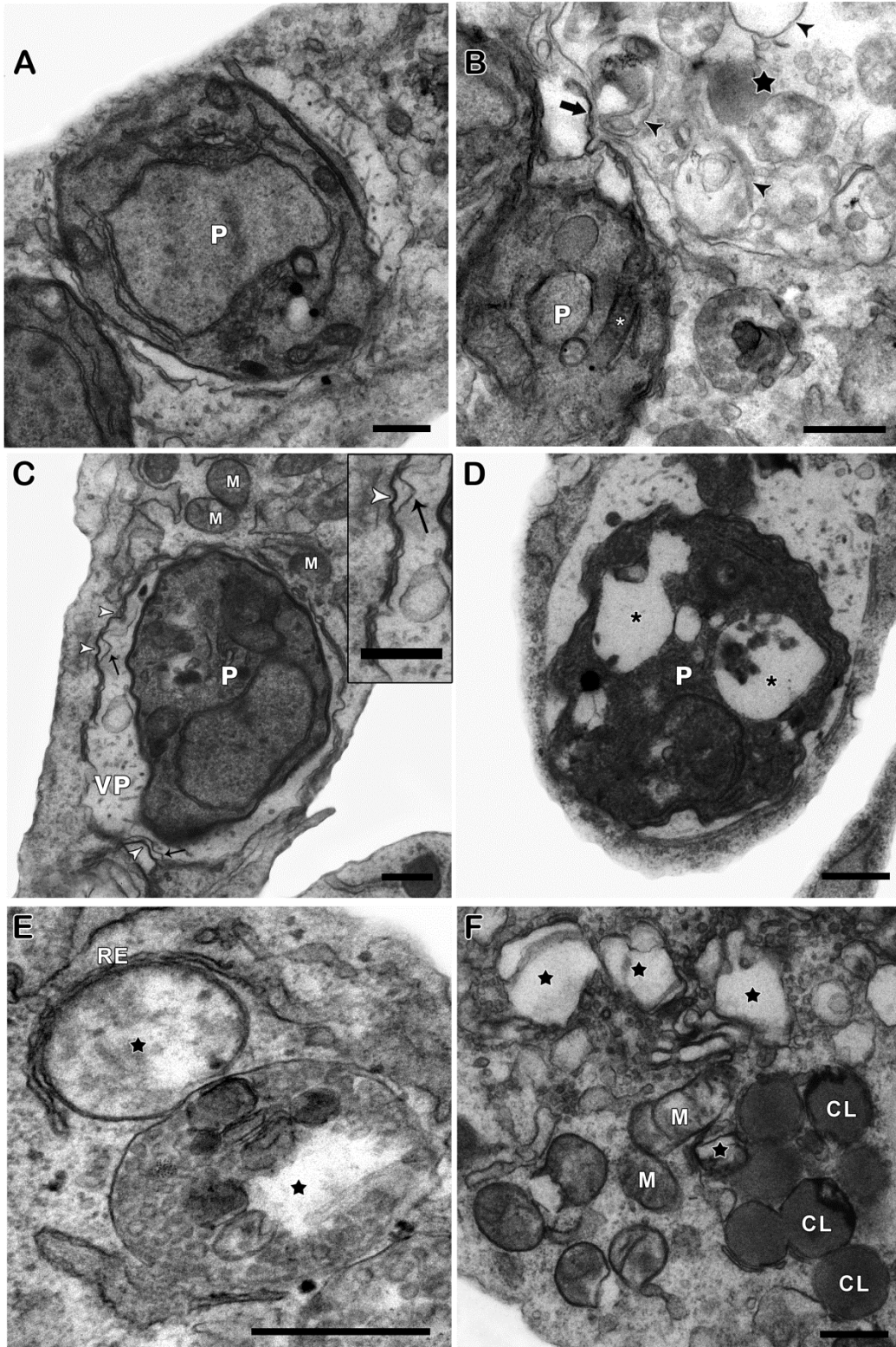
**Figura 4.32. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de CME após 6 h de infecção com *T. gondii*.** (A, B) Taquizoítos (P) com morfologia típica de micronemas (Mic), róptrias (R) e mitocôndrias (asteriscos brancos). **(C-E)** Mitocôndrias (M), autofagossomos (estrelas pretas) contendo material em diferentes estágios de degradação (cabeças de seta pretas) e corpúsculos lipídicos (L) da célula hospedeira próximos ao vacúolo parasitóforo. (F) Detalhe de autofagossomos e corpúsculo lipídico em célula infectada. Barras: 0,5  $\mu$ m



**Figura 4.33. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de CME pré-tratadas com rapamicina, 6 h após a infecção com *T. gondii*.** (A,B) Vacúolo parasitóforo (VP) com membrana desestabilizada (cabeças de setas brancas) contendo taquizoíta (P) apresentando morfologia característica. Vários autofagossomos (estrelas pretas) e mitocôndrias (M) são observados nas suas proximidades. (B) Infiltração de conteúdo citoplasmático (seta larga branca) da célula hospedeira para o interior de um vacúolo parasitóforo (VP) desestabilizado. (C) Parasito (P) apresentando autofagossomos (asteriscos pretos). (D-F) Indução da formação de autofagossomos (estrelas pretas) contendo estruturas membranares concêntricas (MC). Degradação de corpúsculos lipídicos (CL) e inchaço das cisternas do Complexo de Golgi (estrela branca). N: núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5 µm

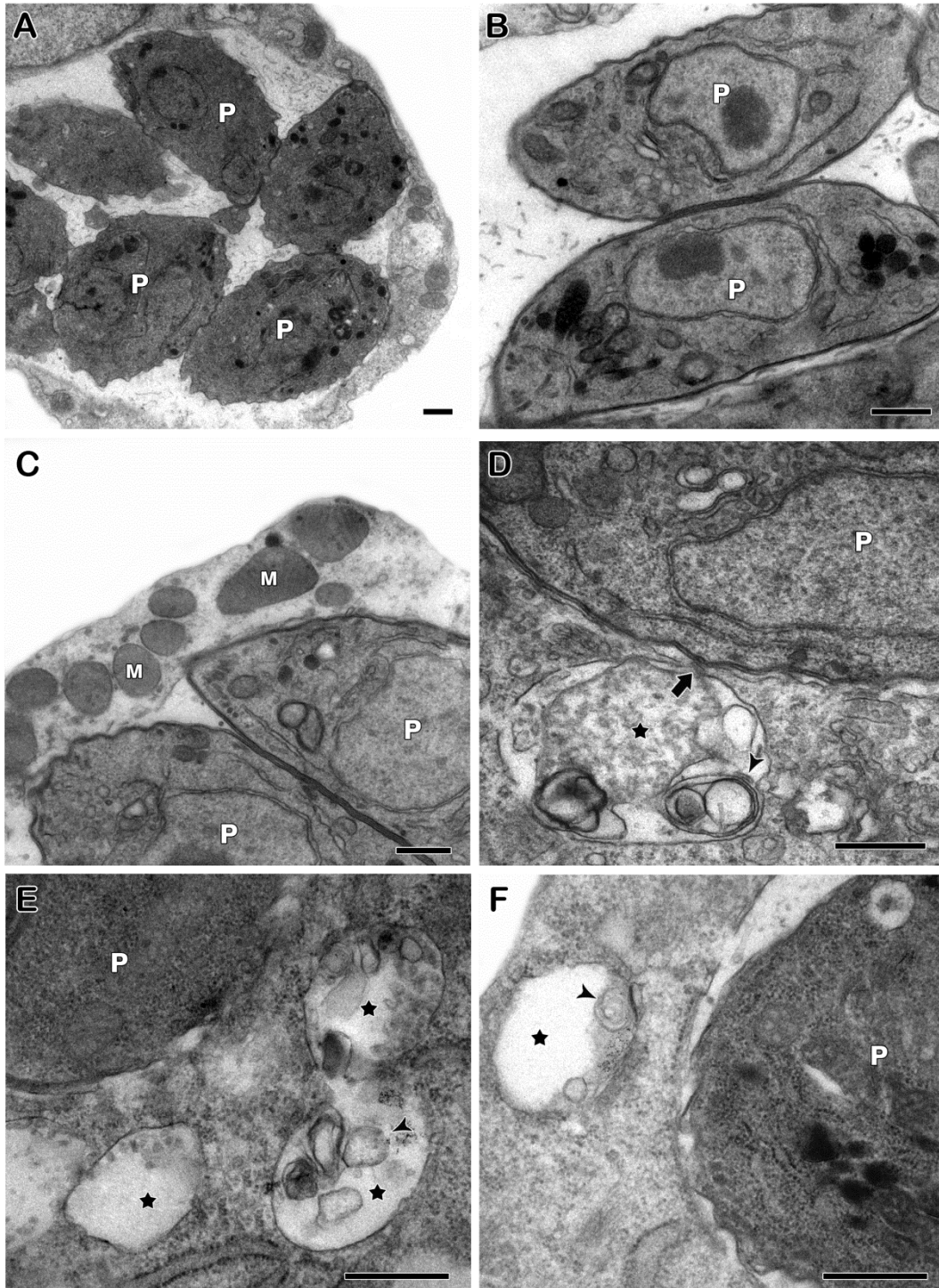


**Figura 4.34. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de CME pré-incubadas em DMEM-/-, 6 h após a infecção com *T. gondii*.** (A) Taquizoíto com morfologia normal (P). (B) Íntimo contato (seta larga preta) do vacúolo parasitóforo contendo taquizoítos íntegros com um grande autofagossomo (estrela preta) apresentando material em diferentes estágios de degradação (cabeças de setas pretas). (C) Taquizoíto no interior de um vacúolo parasitóforo desestabilizado. Em destaque, a membrana do vacúolo parasitóforo (seta preta) envolta por membrana eletrodensa típica de autofagossomo (cabeça de seta branca). (D) Parasito apresentando autofagossomos (asteriscos pretos). (D, E) Autofagossomos (estrelas pretas) com conteúdo em diferentes estágios de degradação, além de perfis de retículo endoplasmático (RE) envolvendo estruturas autofágicas. (F) Corpúsculos lipídicos em processo de degradação (CL) próximos a autofagossomos (estrelas pretas) e mitocôndrias com matriz rarefeita (M). Barras: 0,5 µm

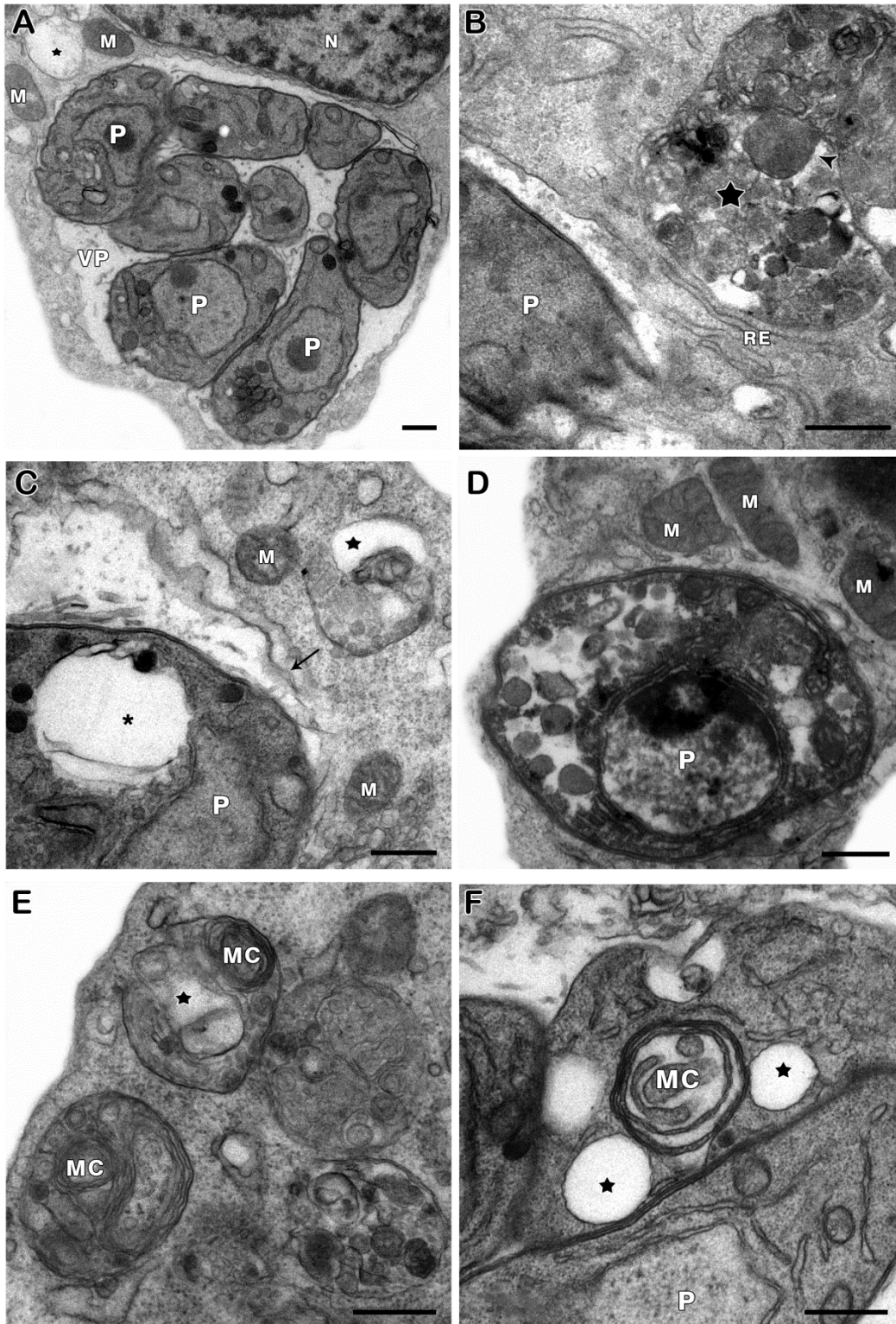


**Figura 4.35. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de CME, 24 h após a infecção com *T. gondii*.** (A-C) Taquizoítos (P) com morfologia típica e mitocôndrias (M) da célula muscular, próximas à membrana do vacúolo parasitóforo. (D-F) Autofagossomos (estrelas pretas) contendo material em diferentes estágios de degradação (cabeças de seta pretas) também foram detectados próximos ao vacúolo (seta larga preta) contendo o parasito (P). Barras: 0,5  $\mu$ m

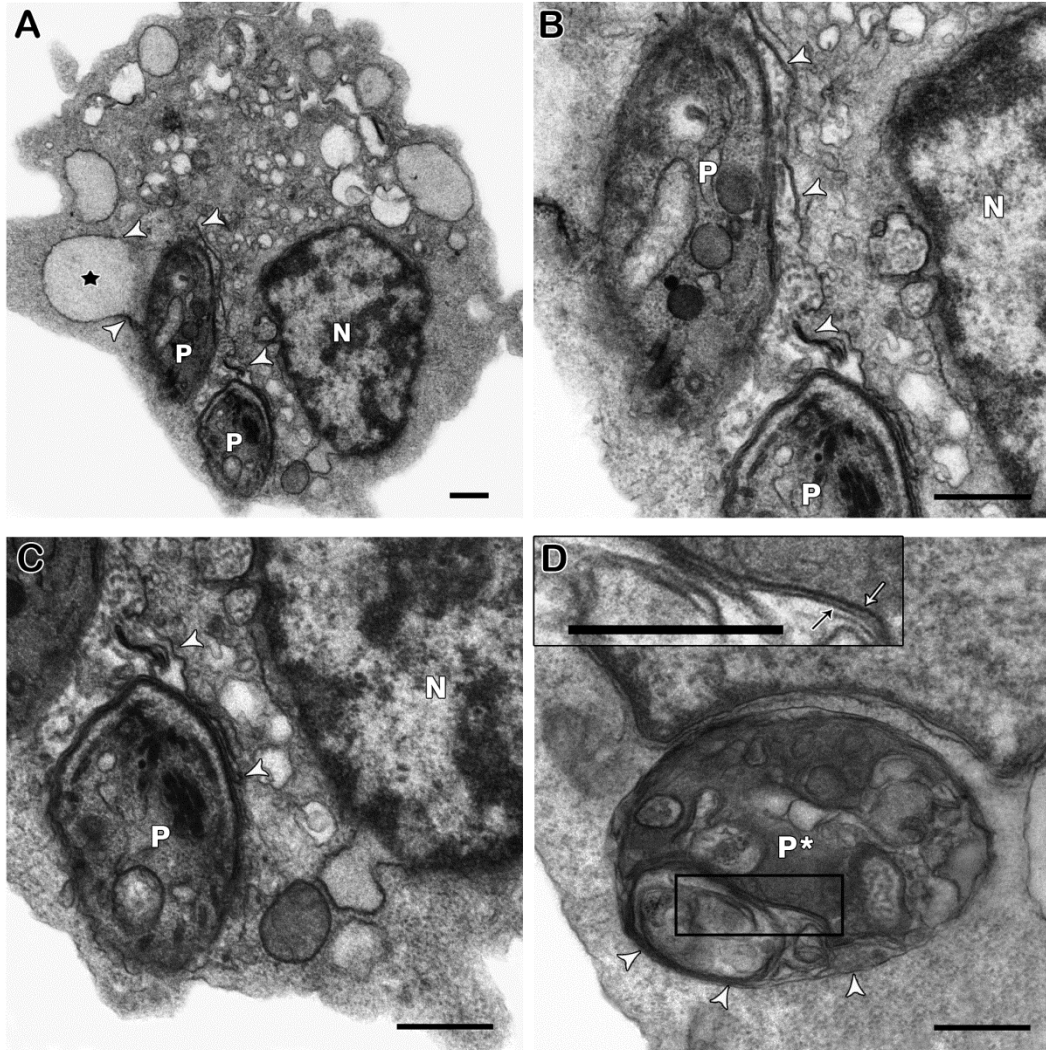




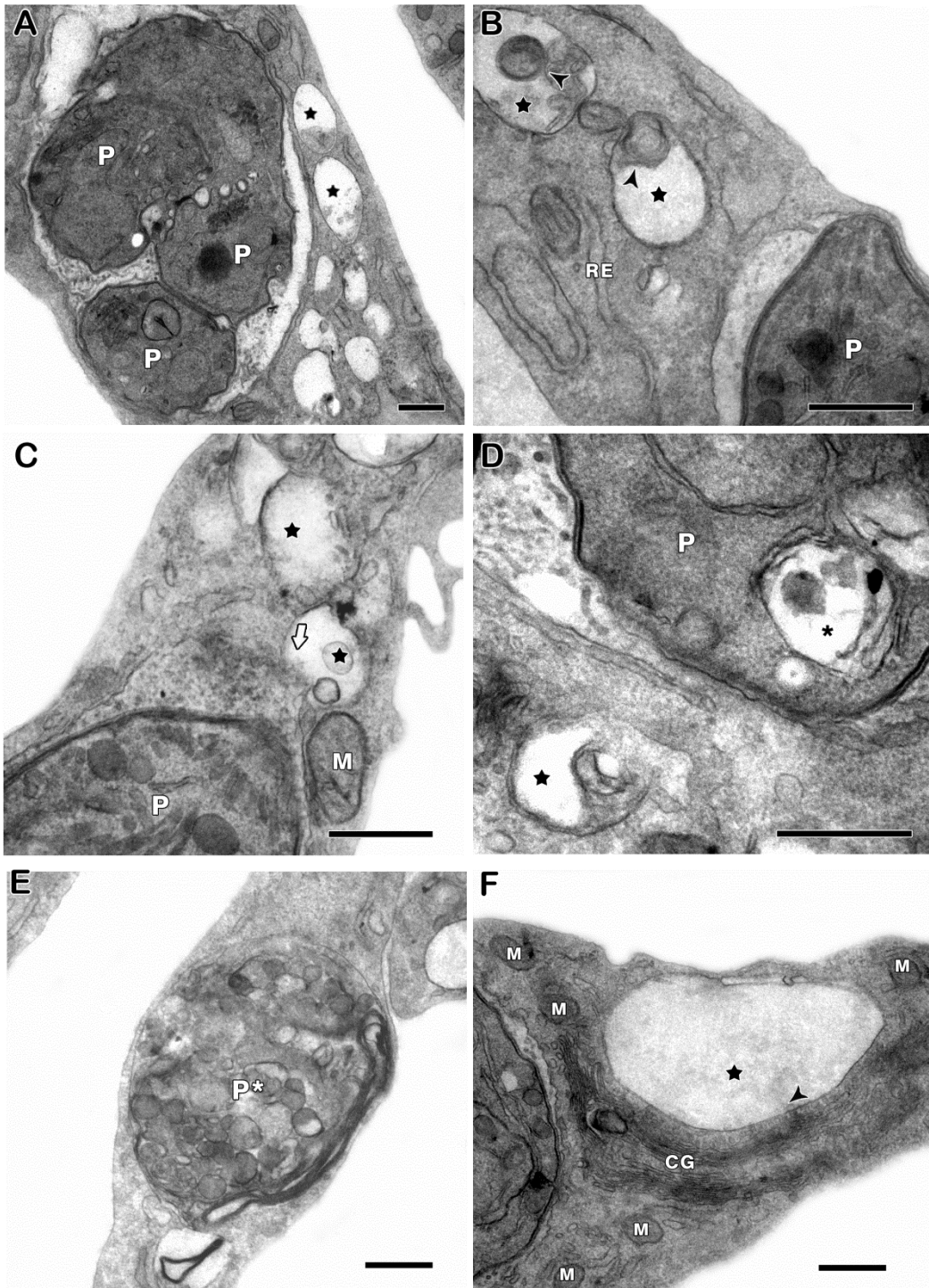
**Figura 4.36. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de CME pré-tratadas com rapamicina, 24 h após a infecção com *T. gondii*.** (A) Taquizoítos (P) com morfologia típica em um vacúolo parasitóforo (VP). Mitocôndrias (M) e autofagossomos (estrela preta) da célula hospedeira foram observados próximos ao VP. (B) Grande autofagossomo (estrela preta) próximo ao parasito (P) e associado ao retículo endoplasmático (RE). (C) Parasito apresentando autofagossomo (asterisco preto) no interior de um VP com membrana desestabilizada (seta preta). (D) Parasito (P) degradado. (E) Autofagossomos (estrelas pretas) apresentando estruturas membranares concêntricas (MC). (F) Autofagossomos no interior de corpo residual proveniente do processo de endodiogenia dos parasitos. N: núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5 µm



**Figura 4.37. Eliminação do *T. gondii* em CME via indução de autofagia por rapamicina.** (A) Fagóforo em processo de englobamento de um taquizoíto (P). (B, C) Regiões de membrana com alta eletrondensidade ao redor de parasitos. (D) Parasito em processo de degradação no interior de um autofagossomo (P\*). Cabeças de setas brancas indicam a membrana do autofagossomo. Em destaque, setas brancas e pretas indicam o complexo membranar interno e a membrana plasmática do parasito, respectivamente. N: núcleo da célula hospedeira. Barras: 0,5  $\mu$ m



**Figura 4.38. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de CME pré-incubadas em DMEM-/-, 24h após a infecção com *T. gondii*.** (A, B) Taquizoítos com morfologia normal (P) em vacúolos parasitóforos próximos à autofagossomos (estrelas pretas) contendo material celular (cabeças de seta pretas) em diferentes estágios de degradação. (C) Imagem sugestiva da fusão entre o vacúolo parasitóforo e um autofagossomo (seta branca larga). (D) Parasito apresentando autofagossomos (asterisco preto) no interior de um vacúolo parasitóforo com membrana desestabilizada, próximo a um autofagossomo da célula hospedeira (estrela preta). (E) Estrutura sugestiva de parasito no interior de um autofagossomo (P\*) em processo avançado de degradação, onde não é possível se identificar organelas típicas. (F) Indução da formação de grande autofagossomo circundado por perfis de complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (M), próximos à membrana ao vacúolo parasitóforo. RE: retículo endoplasmático. Barras: 0,5 µm



## **5. DISCUSSÃO**



A autofagia, tema central deste trabalho, consiste no processo de degradação de componentes celulares e sua remoção através da via fagolisossomal que são eventos chaves para a manutenção da homeostase da célula eucariótica. Dentre outras funções conhecidas, este processo atua como fonte alternativa de nutrientes durante o estresse nutricional, além de participar no controle de estoques lipídicos intracelulares e na interação parasito-célula hospedeira (Andrade et al., 2006; Deretic & Levine, 2009; Romano et al., 2012).

Na presente dissertação, a participação da autofagia durante a interação *T. gondii*-célula hospedeira foi avaliada utilizando-se dois modelos celulares bem distintos em relação a sua capacidade fagocítica: macrófagos (fagócitos profissionais) e células musculares esqueléticas (fagócitos não-profissionais). Os macrófagos são importantes para a compreensão de mecanismos de defesa contra o parasito, e as células musculares, por sua vez, constituem um dos nichos mais importantes da cistogênese *in vivo* do *T. gondii* (Bogdan & Röllinghoff, 1999; Innes, 2010). Desta forma, células musculares esqueléticas provenientes de cultura primária (CME) e as de linhagem, as C2C12 foram avaliadas. Esta linhagem tem sido amplamente empregada como modelo para o estudo da miogênese *in vitro* (Burattini et al., 2004). Além disso, levando-se em consideração que as culturas primárias de CME são mistas contendo além de mioblastos, os fibroblastos que exercem um papel importante no estabelecimento desta cultura, estes também foram incluídos neste estudo.

De maneira geral, a análise por microscopia de luz mostrou que a rapamicina e a restrição de glicose e de SFB (estresse nutricional), típicos indutores autofágicos (Mizushima & Komatsu, 2011), foram capazes de inibir a infecção e a proliferação do *T. gondii* (número de parasitos por célula infectada) em macrófagos, CME, fibroblastos de cultura de CME e C2C12. O efeito de ambos os estímulos autofágicos na infecção e na proliferação do *T. gondii* foi avaliado nos diferentes modelos celulares após 6 e 24 h infecção.

Em 6 h, apenas em macrófagos e em C2C12 foi observada influência da indução da autofagia na infecção. Enquanto em macrófagos, ambos os estímulos autofágicos inibiram a infecção do *T. gondii* neste tempo, nas C2C12 apenas o estresse nutricional, mas não rampamicina, foi capaz de reproduzir tal efeito. Em contrapartida, em 24 h de interação, estes indutores de autofagia inibiram a infecção do *T. gondii* em todos os modelos celulares estudados (**Figuras 4.1A, 4.4A, 4.6A,**

**4.8A).** Tem sido descrito que a invasão do *T. gondii* é essencialmente ativa em células fagocíticas ou não-fagocíticas (Dobrowolski & Sibley, 1996). No entanto, a inibição de mTOR (tipicamente induzida por rapamicina ou estresse nutricional) já foi associada, em tempos curtos, à redução na capacidade fagocítica de macrófagos (Thomson et al, 2009; Yu et al, 2010). Assim, pode-se sugerir a participação da fagocitose na infecção do *T. gondii* nestas células o que justificaria sua inibição em 6 h. Adicionalmente, a inibição da infecção apenas das C2C12 submetidas ao estresse nutricional, nesse mesmo tempo, pode ser o resultado de uma maior susceptibilidade destas células a essa condição, limitando a entrada do parasito.

Em resposta aos estímulos autofágicos, em todas as células estudadas, a partir de 6 h de interação, houve a inibição da proliferação do *T. gondii* com exceção das CME, quando o fenômeno ocorreu somente em 24 h (**Figuras 4.1B, 4.4B, 4.6B, 4.8B**). É interessante ressaltar que Andrade e colaboradores (2006) observaram inibição semelhante em macrófagos tratados com rapamicina 2 h após a interação com o *T. gondii*, o que sugere que a adição da droga anterior ou posterior à infecção não interfere neste processo.

Paralelamente, a análise quantitativa de taquizoítos no sobrenadante das diferentes culturas (provenientes do rompimento das células após ciclo lítico), mostrou em macrófagos submetidos aos estímulos autofágicos uma acentuada redução em relação ao controle em 24 h (**Figura 4.3**). Esses dados são coincidentes com a inibição significativa da infecção e proliferação do parasito observada nesse mesmo tipo celular e tempo de interação. No entanto, em CME e C2C12 não foi encontrado um número significativo de parasitos no sobrenadante nas diferentes condições analisadas, o que pode estar relacionado com o caráter fagocítico não-profissional de células musculares esqueléticas.

De modo geral, a diminuição da infecção e da proliferação do *T. gondii* em todos os modelos celulares estudados foi coincidente com o pré-tratamento das células com rapamicina ou submissão ao estresse nutricional. Desta forma, esses dados sugerem fortemente o envolvimento da via autofágica na eliminação desses parasitos. No entanto, embora rapamicina e estresse nutricional sejam clássicos indutores dessa via, a inibição de mTOR desencadeada por ambos os estímulos pode influenciar em uma série de outros mecanismos celulares (Thomson et al, 2009). Frente a essa hipótese, ampliamos nossa investigação utilizando métodos complementares que confirmassem ou refutassem a participação da autofagia

durante a infecção. Nesse contexto, macrófagos e CME foram eleitos para análise comparativa, por imunofluorescência, do padrão de expressão da proteína autofágica LC3 após 6 e 24 h de infecção.

Inicialmente, foi feita a análise do percentual de células totais LC3+ em culturas de macrófagos e CME infectadas submetidas ou não aos estímulos autofágicos nos diferentes tempos de infecção. Células LC3+ foram consideradas aquelas com pelo menos um ponto definido de marcação, nas quais se considerou a autofagia induzida. Uma vez que a rapamicina e o estresse nutricional, por si só, poderiam estar induzindo a autofagia, a análise de LC3 em culturas de células não infectadas, submetidas ou não aos estímulos autofágicos, também foi realizada.

A infecção pelo *T. gondii* aumentou o número de células LC3+ em 6 e 24 h em culturas de macrófagos e CME controle (células sem estímulo autofágico) ou tratadas com rapamicina (**Figuras 4.10, 4.18**). No entanto, na situação de estresse nutricional, apenas nas culturas de CME tal aumento foi observado nesses tempos (**Figura 4.18**). Esses dados sugerem que a autofagia é induzida pela infecção do *T. gondii* nos dois modelos celulares independente de estímulo autofágico. Além disso, o perfil similar e a alta porcentagem de células LC3+ observados nas culturas de macrófagos, infectados ou não, submetidos a estresse nutricional nos dois tempos, sugere que ocorra uma maior suscetibilidade deste modelo a esse estímulo autofágico.

A análise comparativa entre as culturas de CME e macrófagos infectadas e tratadas com rapamicina, em relação aos respectivos controles (células infectadas não tratadas), não mostrou diferença significativa no número de células totais LC3+ nos diferentes tempos de infecção (**Figuras 4.10, 4.18**). Esses dados sugerem que, nestes tempos, a infecção na ausência de estímulo autofágico influencia no percentual de células LC3+ de modo similar à infecção após tratamento com rapamicina. No entanto, as culturas de CME e de macrófagos infectadas submetidas a estresse nutricional mostraram um aumento no número de células totais LC3+ em relação aos controles (células apenas infectadas) após 6 e 24 h (**Figuras 4.10B, 4.18**), respectivamente. Assim, diferentemente do observado para rapamicina, tal resultado sugere que a infecção após estresse nutricional influencia no percentual de células totais LC3+ de maneira mais eficiente, nesses tempos, do que as culturas apenas infectadas.

Em um segundo momento, o perfil de expressão de LC3 também foi avaliado apenas nas células infectadas das culturas de macrófagos e CME. Após 6 e 24 h foi observado um grande percentual de células infectadas LC3+ em ambas as culturas, com pouca ou nenhuma diferença para as células submetidas aos dois estímulos autofágicos, em relação aos respectivos controles (culturas apenas infectadas) (**Figuras 4.17 e 4.25**). Assim, esses dados sugerem contribuição efetiva das células infectadas no percentual de células totais LC3+, determinado anteriormente para macrófagos e CME.

Diante desses dados é válido ressaltar que o *T. gondii* tem sucesso na infecção tanto em macrófagos não ativados quanto nas CME. Assim, supondo ser a autofagia responsável pela diminuição tanto da infecção quanto da proliferação do parasito, não seria esperada a indução desta via mesmo em células infectadas não submetidas aos estímulos autofágicos. Nesse ponto é interessante destacar que os dados de imunofluorescência até agora apresentados não refletem a intensidade da autofagia por célula em cada condição analisada. Embora experimentos adicionais sejam necessários, a análise qualitativa da imunofluorescência para LC3 sugere que CME infectadas após estímulo autofágico apresentaram uma maior expressão desse marcador por célula que aquelas apenas infectadas (**Figuras 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24**). Adicionalmente, pontos maiores de marcação para LC3 foram observados nos macrófagos (**Figuras 4.12D, 4.13F; 4.15D, 4.16D**) e nas CME (**Figuras 4.20F, 4.21B; 4.23F, 4.24F**) infectados tratados com rapamicina ou submetidos ao estresse nutricional se comparados aos respectivos controles (células apenas infectadas). Assim, esses resultados sugerem possíveis diferenças no mecanismo de ação da via autofágica entre as células submetidas ou não aos diferentes estímulos autofágicos.

Uma vez confirmada a indução da autofagia pelo *T. gondii* em macrófagos e CME submetidos ou não aos estímulos autofágicos, foram avaliados aspectos morfológicos das diferentes culturas no curso da infecção. A análise ultraestrutural mostrou a presença de autofagossomos com conteúdo em diferentes estágios de degradação em ambas as culturas nas diferentes condições e tempos avaliados. Esses autofagossomos, assim como mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático, foram observados nas proximidades do parasito ou em íntimo contato com a membrana do vacúolo parasitóforo (**Figuras 4.26C, 4.27D, 4.28C, 4.29D, 4.30C, 4.31B, 4.32D, 4.33F, 4.34C, 4.35C, 4.36B, 4.38C**). Esses achados

são compatíveis com os de imunofluorescência para ambos os modelos, uma vez que vesículas de LC3, primariamente representativas de autofagossomos (Mizushima et al., 2010), também foram observadas nas proximidades do parasito a partir de 6 h de infecção.

O recrutamento de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e lisossomos em torno do vacúolo parasitóforo durante o desenvolvimento intracelular do *T. gondii* tem sido bem caracterizado. De modo geral, a íntima interação dessas organelas com o vacúolo parasitóforo tem mostrado contribuir na captação pelo parasito de nutrientes provenientes da célula hospedeira, uma vez que o protozoário é incapaz de sintetizar *de novo* moléculas como glicose, aminoácidos, ferro, colesterol e purinas (Schwartzman & Pfefferkorn, 1982; Pfefferkorn, 1984; Coppens et al., 2000; Fox et al., 2004; Gail et al., 2004; Coppens et al., 2006). Adicionalmente, Wang e colaboradores (2009) mostraram que a autofagia de células HeLa e MEFs é estimulada pela infecção do *T. gondii* que explora a função nutritiva dessa via, utilizando-a para impulsionar o seu crescimento. Nessas células (HeLa e MEFs), assim como em macrófagos e CME, foi observado por imunofluorescência o acúmulo de vesículas contendo LC3 nas proximidades do parasito. Com base na literatura e nos resultados do presente trabalho, sugere-se que o recrutamento de estruturas autofágicas da célula hospedeira para o vacúolo parasitóforo possa estar sendo utilizado pelo *T. gondii* na aquisição de nutrientes necessários à sua sobrevivência e crescimento.

A inativação de mTOR, um regulador central do crescimento celular e do metabolismo, medeia a autofagia induzida por estresse nutricional ou por rapamicina (Wullschleger et al., 2006; Mizushima & Komatsu, 2011). No entanto, Wang e colaboradores (2009) mostraram que a indução da autofagia em células HeLa e MEFs pela infecção do *T. gondii* ocorre independentemente da atividade dessa proteína. Uma vez que o *T. gondii*, no presente trabalho, foi capaz de induzir também a autofagia em macrófagos e CME não sujeitos a estímulos autofágicos, possivelmente a indução dessa via nesses dois modelos e na mesma condição independa dessa molécula.

A associação de mitocôndrias, perfis de retículo endoplasmático e Golgi com autofagossomos também pôde ser observada em macrófagos e CME (**Figuras 4.26E, 4.28F, 4.31C, 4.34E, 4.36C, 4.38F**) sendo mais frequente nas células tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional que nas células não

tratadas. Estas observações reforçam as principais hipóteses a respeito da origem da membrana do autofagossomo que parece ser proveniente tanto da síntese *de novo* no citoplasma quanto das membranas: plasmática, da mitocôndria, do retículo endoplasmático e do Golgi (Kovacs et al., 2007; Militello & Colombo, 2011).

No entanto, embora a autofagia tenha sido induzida pelo *T. gondii* independentemente de estímulo autofágico, os aspectos morfológicos da resposta dos macrófagos e das CME à infecção nas células tratadas com rapamicina (**Figuras 4.27, 4.30, 4.33, 4.36**) ou submetidas a estresse nutricional (**Figuras 4.28, 4.31, 4.34, 4.38**) foram bastante diferentes em relação ao controle (ausência de estímulo autofágico) (**Figuras 4.26, 4.29, 4.32, 4.35**). Na ausência de estímulo autofágico, foi observado apenas o íntimo contato de autofagossomos com a membrana do vacúolo parasitóforo (**Figuras 4.26, 4.29, 4.32, 4.35**) nos dois modelos celulares. Diante dos dados apresentados, esses resultados sugerem que na condição de ausência de estímulo autofágico, o papel da autofagia esteja relacionado, principalmente, à captação de nutrientes da célula hospedeira por parte do parasito. Em contrapartida, nas células incubadas com rapamicina ou DMEM/-/, estruturas sugestivas de parasitos em processo avançado de degradação foram observadas no interior de autofagossomos (**Figuras. 4.27E, 4.28E, 4.30D, 4.34D, 4.36D, 4.37D, 4.38E**). Tal fenótipo trouxe fortes indícios de eliminação do *T. gondii* pela via autofágica da célula hospedeira, justificando assim a diminuição da proliferação do patógeno observada em todos os modelos celulares estudados.

Ainda com relação às células tratadas com rapamicina ou submetidas a estresse nutricional, as análises ultraestruturais sugerem, para ambas as condições, dois mecanismos de ação da via autofágica da célula hospedeira na eliminação do *T. gondii*. O primeiro mecanismo inclui o recrutamento de perfis de retículo endoplasmático para o vacúolo parasitóforo; formação de membrana eletrodensa, tipicamente observada em autofagossomos (Eskelinen, 2008) em torno do vacúolo; desestabilização e ruptura da membrana do vacúolo; envolvimento dos parasitos livres no citoplasma por autofagossomos; e o redirecionamento dos mesmos aos lisossomos para degradação (**Figuras 4.31, 4.34, 4.37**). Ling e colaboradores (2006) e Zhao e colaboradores (2007) utilizando macrófagos infectados com *T. gondii* mostraram que, sob a ação de INF- $\gamma$ , a autofagia atua na eliminação de parasitos cujas membranas do vacúolo parasitóforo e plasmática foram danificadas pela ação das GTPases p47. Nesse caso, a eliminação do parasito danificado pela via

autofágica da célula hospedeira tem se mostrado fundamental como medida preventiva de necrose. Em conjunto, esses resultados e os apresentados nesta dissertação indicam que INF- $\gamma$ , rapamicina e o estresse nutricional induzem a via autofágica por mecanismos similares na resposta à infecção do *T. gondii*.

Um segundo mecanismo sugere, inicialmente, o recrutamento de estruturas autofágicas, provavelmente já contendo proteases lisossomais (autofagolisossomos), ao vacúolo parasitóforo, seguida da fusão da membrana dessas estruturas com a membrana do vacúolo o que determinaria a degradação do parasito na célula hospedeira (**Figuras 4.27, 4.28, 4.38**). Esses eventos se assemelham aos observados em trabalhos anteriores para macrófagos infectados com *T. gondii* quando estimulados pela via CD40 (Andrade et al., 2006; Ling et al., 2006). Nesses estudos, a imunidade celular mediada pela indução dessa via mostrou ser capaz de eliminar o *T. gondii in vitro* e *in vivo*, ainda no interior do vacúolo parasitóforo. Nesse ponto é importante esclarecer, tendo em vista os dois mecanismos propostos, que embora tenha sido observada a presença de estruturas sugestivas de parasitos em estágio final de degradação no interior de estruturas autofágicas em ambas as células, análises complementares serão necessárias para confirmar a fusão autofagolisossomal.

Embora nesta dissertação fortes indícios do envolvimento da via autofágica da célula hospedeira na eliminação do *T. gondii* tenham sido encontrados tanto em macrófagos quanto nas CME, não se pode descartar o possível efeito da rapamicina e do estresse nutricional também no parasito. Foram observados parasitos contendo autofagossomos tanto por análise de imunofluorescência quanto por microscopia eletrônica, nos dois modelos celulares, submetidos aos dois estímulos autofágicos (**Figuras 4.12F, 4.15B, 4.15D, 4.15F, 4.27B, 4.30B, 4.33C, 4.34D, 4.36C, 4.38D**). Ghosh e colaboradores (2012) mostraram a formação de autofagossomos em taquizoítos presentes em células HFF após 8 h de restrição de aminoácidos. No presente trabalho, o estresse nutricional foi induzido em macrófagos e CME pela restrição de glicose e de SFB. Assim, os dois tipos de estresse nutricional - restrição de aminoácidos e de glicose + SFB - são eficientes na indução da autofagia do *T. gondii*. Neste ponto, é importante lembrar que a autofagia tem se mostrado essencial para o crescimento intracelular do *T. gondii* (Besteiro et al., 2011). Além disso, assim como em outros eucariotos, a autofagia nesse protozoário funcionaria como um mecanismo de sobrevivência tanto em condições fisiológicas como de estresse.

Entretanto, em situações de estresse contínuo, esta via representa um mecanismo de morte para o parasito (Besteiro, 2012). Dessa forma, não se pode descartar a hipótese de que ambos os estímulos autofágicos possam ter auxiliado na eliminação do *T. gondii* tanto em macrófagos quanto nas CME pela exacerbação da via autofágica do parasito.

Por fim, a totalidade de dados aqui apresentados sugerem participação efetiva da via autofágica da célula hospedeira no estabelecimento da infecção do *T. gondii* nos diferentes modelos celulares avaliados. Além disso, a rapamicina e a restrição de glicose e de SFB, indutores autofágicos, foram capazes de inibir a proliferação do *T. gondii* em fagócitos profissionais e não-profissionais por mecanismos que parecem envolver tanto a autofagia da célula hospedeira quanto do parasito. Diante disso, os nossos resultados ainda encorajam a utilização da rapamicina como modelo para o estudo da autofagia *in vivo* durante a infecção aguda do *T. gondii*.



## **6. CONCLUSÕES**

1. A rapamicina e o estresse nutricional (restrição de glicose e de SFB) foram capazes de inibir tanto a infecção quanto a proliferação do *T. gondii* em macrófagos peritoneais, CME, fibroblastos de cultura de CME e linhagem C2C12.
2. A infecção pelo *T. gondii* mostrou induzir autofagia tanto em macrófagos peritoneais quanto nas CME independentemente de estímulos autofágicos em 6 e 24h de infecção.
3. A capacidade do *T. gondii* intracelular induzir naturalmente a autofagia em macrófagos e CME sugere que o parasito utilize essa estratégia para captação de nutrientes da célula hospedeira.
4. Os aspectos morfológicos das culturas de macrófagos e CME infectadas submetidas aos estímulos autofágicos sugerem a eliminação do *T. gondii* por mecanismos que envolvem tanto a autofagia da célula hospedeira quanto a autofagia do parasito.
5. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a utilização da rapamicina como um interessante modelo para o estudo da autofagia *in vivo* durante a infecção aguda do *T. gondii*.

## **7. REFERÊNCIAS**

- Amato Neto, V., Medeiros, E. A. S., Levi, G. C., Duarte, M. I. S. Toxoplasmose. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 154p.
- Andrade EF, Stumbo AC, Monteiro-Leal 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.
- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. J Clin Invest. 2006;116(9):2366-77.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis. 2003;9(1):55-62.
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. Mol Cell Biol. 2008;28(18):5747-63.
- Barbosa HS, Ferreira-Silva MF, Guimaraes EV, Carvalho L, Rodrigues RM. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. J Parasitol. 2005;91(1):182-4.
- Bayarri S, Gracia MJ, Perez-Arquillue C, Lazaro R, Herrera A. *Toxoplasma gondii* in commercially available pork meat and cured ham: a contribution to risk assessment for consumers. J Food Prot. 2012;75(3):597-600.
- Beaman MH, Luft BJ, Remington JS. Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. Ann Intern Med. 1992;117(2):163-4.
- Besteiro S. Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan parasites? Mol Biochem Parasitol. 2012 Jul;184(1):1-8.
- Besteiro S, Brooks CF, Striepen B, Dubremetz JF. Autophagy protein Atg3 is essential for maintaining mitochondrial integrity and for normal intracellular development of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. PLoS Pathog. 2011;7(12):e1002416.
- Beverly JKA. A rational approach to the treatment of *Toxoplasma* uveitis. Trans. Ophthalmol. Soc.U.K. 1958; 78: 109-121.

- Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(3):607-23.
- Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. APMIS. 2009;117(5-6):458-76.
- Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. Ophthalmology. 1998;105(6):1032-7.
- Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? Parasitol Today. 1999;15(1):22-8.
- Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. Eur J Histochem. 2004;48(3):223-33.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. Cell Microbiol. 1999;1(3):225-35.
- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol. 1997;73(2):114-23.
- Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. Subcell Biochem. 2008;47:33-45.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection) - Epidemiology & Risk Factors. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>. Acesso em: 06 de jun. 2013.
- Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. Traffic. 2008;9(5):657-64.
- Chang YY, Juhasz G, Goraksha-Hicks P, Arsham AM, Mallin DR, Muller LK, et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. Biochem Soc Trans. 2009;37(Pt 1):232-6.
- Che FY, Madrid-Aliste C, Burd B, Zhang H, Nieves E, Kim K, et al. Comprehensive proteomic analysis of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. Mol Cell Proteomics. 2011;10(1):M110 000745.

- Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368(19):1845-6.
- Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(1):7-12.
- Colombo MI, Gutierrez MG, Romano PS. The two faces of autophagy: Coxiella and Mycobacterium. *Autophagy.* 2006;2(3):162-4.
- 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.
- Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol.* 2000;149(1):167-80.
- Deckert M, Sedgwick JD, Fischer E, Schluter D. Regulation of microglial cell responses in murine *Toxoplasma* encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. *Acta Neuropathol.* 2006;111(6):548-58.
- DeFeo ML, Dubey JP, Mather TN, Rhodes RC, 3rd. Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. *Am J Vet Res.* 2002;63(12):1714-7.
- Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* 2009;5(6):527-49.
- De Souza W. [Demonstration and structure of the microtubular system in *Toxoplasma gondii*]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1972;275(25):2899-901.
- De Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica.* (Porto Alegre). 2010; 20 (1): 131-143.
- Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 1967;33(2):437-49.
- Dlugonska H. *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. *J Biomed Biotechnol.* 2008;2008:632424.
- Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 1997;26(1):163-73.

- Dobrowolski JM, Sibley LD. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 1996;84(6):933-9.
- Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle*. 2010;9(7):1295-307.
- Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with T gondii oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res*. 1988;49(6):910-3.
- Dubey, J. P. Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and other tissue cystforming coccidia of man and animals. In: Parasitic Protozoa. New York: Academic Press, 1977, 101–237.
- Dubey JP. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1994;205(11):1593-8.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55(6):467-75.
- Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, Jones JL. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in different types of commercial cat litter. *J Parasitol*. 2011;97(5):751-4.
- Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool*. 1972;19(1):155-77.
- 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.
- Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol*. 1998;6(1):27-30.
- Duque TLA. Avaliação da participação da autofagia de células hospedeiras durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. Belo Horizonte. Dissertação [mestrado em Biologia Celular] – Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
- Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdron-Lopez M, Colombo MI, Coombs GH, et al. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011;7(2):127-58.
- Epple UD, Suriapranata I, Eskelinen EL, Thumm M. Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol*. 2001;183(20):5942-55.
- Eskelinen EL. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*. 2008;4(2):257-60.

- Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):664-73.
- Eyles DE, Coleman N. Sinergistic effect of sulfadiazine and daraprim against toxoplasmosis in mice. *Antibiot. Chemother*. 1953; 3: 483-490.
- Ferreira da Silva Mda F, Barbosa HS, Gross U, Luder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*. 2008;4(8):824-34.
- Ferreira-da-Silva Mda F, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho L, Gross U, Luder CG, et al. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):196-200.
- Ferreira-da-Silva Mda F, Takacs AC, Barbosa HS, Gross U, Luder CG. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int J Med Microbiol*. 2009;299(5):381-8.
- Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*. 1973;23:343-352
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970;167(3919):893-6.
- Fritz HM, Bowyer PW, Bogyo M, Conrad PA, Boothroyd JC. Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. *PLoS One*. 2012;7(1):e29955.
- Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol*. 2004;34(3):323-31.
- Gail M, Gross U, Bohne W. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. *Parasitol Res*. 2004;94(3):233-9.
- Gardner MJ, Bates PA, Ling IT, Moore DJ, McCready S, Gunasekera MB, et al. Mitochondrial DNA of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988;31(1):11-7.
- Gavinet MF, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, et al. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1276-7.



- Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, Drier de Laforte T, Peyron F. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. *Prenat Diagn.* 2003;23(7):558-60.
- Gazzinelli RT, Eltoun I, Wynn TA, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol.* 1993;151(7):3672-81.
- Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol.* 1991;146(1):286-92.
- Gellin BG, Soave R. Coccidian infections in AIDS. Toxoplasmosis, cryptosporidiosis, and isosporiasis. *Med Clin North Am.* 1992;76(1):205-34.
- Ghosh D, Walton JL, Roepe PD, Sinai AP. Autophagy is a cell death mechanism in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2012;14(4):589-607
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.
- Gomes AF, Guimaraes EV, Carvalho L, Correa JR, Mendonca-Lima L, Barbosa HS. *Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis. *BMC Microbiol.* 2011;11:110.
- Gross U. [Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2004;47(7):692-7.
- Gross U, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today.* 1996;12(1):30-3.
- Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional Toxoplasma Working Group. *N Engl J Med.* 1994;330(26):1858-63.
- Guimarães EV, Acquarone M, Carvalho L, Barbosa HS. Cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in skeletal muscle cells *in vitro*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2002 44:104

- Guimaraes 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.
- Guimaraes EV, 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.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J Biol Chem. 2007;282(52):37298-302.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet. 2009;43:67-93.
- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005;6(1):41-61.
- Hofhuis A, van Pelt W, van Duynhoven YT, Nijhuis CD, Mollema L, van der Klis FR, et al. Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. Epidemiol Infect. 2011;139(4):530-8.
- Holland GN. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. Am J Ophthalmol. 1999;128(4):502-5.
- Hu K, Roos DS, Murray JM. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. J Cell Biol. 2002;156(6):1039-50.
- Huang J, Brumell JH. Autophagy in immunity against intracellular bacteria. Curr Top Microbiol Immunol. 2009;335:189-215.
- Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. Cancer Biol Ther. 2003;2(3):222-32.
- Huo Y, Iadevaia V, Proud CG. Differing effects of rapamycin and mTOR kinase inhibitors on protein synthesis. Biochem Soc Trans. 2011;39(2):446-50.
- Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health. 2010;57(1):1-7.
- Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. Am J Trop Med Hyg. 1972;21(5):512-7.
- Janku J. Pathogenese et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmique avec parasite dans la rétine. Coposis le Karuv 1923;62:1021-1027.

- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*. 1990;249(4969):641-6.
- Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):10-25.
- Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 2012;55(6):845-51.
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(3):405-10.
- Juenemann K, Reits EA. Alternative macroautophagic pathways. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:189794.
- Karsten V, Qi H, Beckers CJ, Reddy A, Dubremetz JF, Webster P, et al. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J Cell Biol*. 1998;141(6):1323-33.
- Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. Antiparasitic therapy. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(6):561-83.
- Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012;22(8):407-17.
- Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(9):2980-92.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*. 2003;5(4):539-45.
- Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 1997;275(5305):1485-9.
- Koskiniemi M, Lappalainen M, Hedman K. Toxoplasmosis needs evaluation. An overview and proposals. *Am J Dis Child*. 1989;143(6):724-8.
- Kovacs AL, Palfia Z, Rez G, Vellai T, Kovacs J. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy*. 2007;3(6):655-62.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010;40(2):280-93.

- Kunz J, Hall MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci.* 1993;18(9):334-8.
- Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:736905.
- Lee YJ, Song HO, Lee YH, Ryu JS, Ahn MH. Proliferation of *Toxoplasma gondii* Suppresses Host Cell Autophagy. *Korean J Parasitol.* 2013;51(3):279-87.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):323-35.
- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(7):1125-36.
- Liesenfeld, O., Wong, S. Y., Remington, J. S. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett, J. G., Merigan, T. C., Bolognesi, D., eds. *Textbook of AIDS medicine.* 2. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999, p. 225-259
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med.* 2006;203(9):2063-71.
- Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA.* 1984;252(7):913-7.
- Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* 2005;35(8):829-49.
- Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(4):346-50.
- McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin Infect Dis.* 1994;18(1):38-72.
- Militello RD, Colombo MI. A membrane is born: origin of the autophagosomal compartment. *Curr Mol Med.* 2011;11(3):197-203.
- Mizushima N. Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;335:71-84.

- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140(3):313-26.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363(9425):1965-76.
- Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 1996;23(2):277-82.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2008;47(4):554-66.
- Mordue DG, Sibley LD. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol*. 1997;159(9):4452-9.
- Morrisette NS, Murray JM, Roos DS. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 1997;110 ( Pt 1):35-42.
- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(1):21-38; table of contents.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Moura M.A., Amendoeira, M.R., Barbosa, 503 H.S.,. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 862-864.
- National Center for Biotechnology information Taxonomy - NCBI Taxonomy – *Toxoplasma gondii*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5811> Acesso em: 11 de jun. 2013
- Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*. 2013;15(4):406-16.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C.R. Seances Acad. Sci*. 1909; 148: 369-372.
- Nichols BA, Chiappino ML, Pavesio CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 1994;80(2):91-8.

- Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(7):719-26.
- Orvedahl A, Levine B. Viral evasion of autophagy. *Autophagy.* 2008 Apr;4(3):280-5.
- Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(3):908-12.
- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 2009;11(2):181-90.
- Pinkerton H, Henderson RG. Adult toxoplasmosis. A previously unrecognized disease entry simulating the typhus-spotted fever group. *J. Am. Med. Assoc.* 1941; 116: 807-814.
- Pinkerton H, Weinman D. *Toxoplasma* infection in man. *Arch. Pathol.* 1940; 30: 374-392
- Porchet-Hennere, E., E. Vivier, and G. Torpier. Origine des membranes de la paroi chez *Toxoplasma*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1985; 60:101–110.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1383-435.
- Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. Autophagy: more than a nonselective pathway. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:219625.
- Remington JS, Cavanaugh EN. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med.* 1965;273(24):1308-10.
- Remington, J. S., McLeod, R., Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S.; Klein, J. O. *Infectious diseases of the fetus & newborn infant.* 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995, p. 140-267.
- Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264-96.
- Rodrigues CO, Ruiz FA, Rohloff P, Scott DA, Moreno SN. Characterization of isolated acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* tachyzoites reveals a novel pool of hydrolyzable polyphosphate. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48650-6.

- Rohloff P, Miranda K, Rodrigues JC, Fang J, Galizzi M, Plattner H, et al. Calcium uptake and proton transport by acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. PLoS One. 2011;6(4):e18390.
- Romano PS, Arboit MA, Vazquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. Autophagy. 2009;5(1):6-18.
- Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. IUBMB Life. 2012;64(5):387-96.
- Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). Science. 1948;108(2815):660-3.
- Sabin AB, Olitsky PK. *Toxoplasma* and Obligat Intracellular Parasitism. Science. 1937;85(2205):336-8.
- Sabin, A. B. & Warren, J.. Therapeutic effectiveness of certain sulfonamide on infection by an intracellular protozoon (*Toxoplasma*). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942 51:19–23.
- Sanchez, R.M., Gordo, R.B., Amador, E.A., Berrio, L.A. Prevalência de infecção toxoplásmica em gestantes de la província la Habana. Ver. Inst. Med. Tropical São Paulo. 1994. 36 (5):445-450
- Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, et al. The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. EMBO J. 2009;28(9):1341-50.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011;17(1):7-15.
- Schwartzman JD, Pfefferkorn ER. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. Exp Parasitol. 1982;53(1):77-86.
- Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2003;3(2):99-109.
- Sheffield HG, Melton ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1968;54(2):209-26.

- Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*. 2011;7(5):457-65.
- Shpilka T, Elazar Z. Essential role for the mammalian ATG8 isoform LC3C in xenophagy. *Mol Cell*. 2012 ;48(3):325-6.
- Sinai AP. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem*. 2008;47:155-64.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131-5.
- Soheilian M, Sadoughi MM, Ghajarnia M, Dehghan MH, Yazdani S, Behboudi H, et al. Prospective randomized trial of trimethoprim/sulfamethoxazole versus pyrimethamine and sulfadiazine in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*. 2005;112(11):1876-82.
- 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.
- Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 2002 ;185 Suppl 1:S58-65.
- Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*. 1992;119(2):301-11.
- Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36268-76.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1217-58.
- Teutsch SM, Juranek DD, Sulzer A, Dubey JP, Sikes RK. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N Engl J Med*. 1979;300(13):695-9.
- Thiebaut R, Leproust S, Chene G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007;369(9556):115-22.
- Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):324-37.



- Torre D, Casari S, Speranza F, Donisi A, Gregis G, Poggio A, et al. Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(6):1346-9.
- 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 –1781.
- Uttenweiler A, Schwarz H, Mayer A. Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca<sup>2+</sup>-independent function. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33289-97.
- Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brezin AP, Thulliez P, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill.* 2010;15(25).
- Vogel N, Kirisits M, Michael E, Bach H, Hostetter M, Boyer K, et al. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis.* 1996;23(5):1055-60.
- Wang K, Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy.* 2011;7(3):297-300.
- Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *J Biol Chem.* 2009;284(3):1694-701.
- Weller PF, Bozza PT, Yu W, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118(2-4):450-2.
- Winstanley P. Drug treatment of toxoplasmic encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Postgrad Med J.* 1995;71(837):404-8.
- Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoon encephalomyelitis. A new protozoan disease of man. *Bull. Neurol. Inst.* 1937; 6: 306-371.
- Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 2010;13(7):805-11.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-84.
- Yang Z, Klionsky DJ. Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. *Autophagy.* 2007;3(2):149-50.

- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):814-22.
- Yap GS, Ling Y, Zhao Y. Autophagic elimination of intracellular parasites: convergent induction by IFN-gamma and CD40 ligation? *Autophagy.* 2007;3(2):163-5.
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 2010;465(7300):942-6.
- Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS. Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. *Infect Immun.* 2007;75(10):4799-803.
- Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe.* 2008;4(5):458-69.

## **8. ANEXO**

**Duque TLA, Souto, XM, Andrade-Neto, VV, Ennes-Vidal, V, Menna-Barreto, RFS.**  
Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A Molecular, Biochemical and  
Morphological Review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections. In: Yannick  
Bailly. *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* Croatia: InTech;  
2013. p. 289-319.

---

## Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A Molecular, Biochemical and Morphological Review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections

---

Thabata Lopes Alberto Duque,  
Xênia Macedo Souto,  
Valter Viana de Andrade-Neto,  
Vítor Ennes-Vidal and  
Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/54970>

---

### 1. Introduction

Protozoa are unicellular eukaryotes that are able to live as parasites or as free-living organisms and interact with a great variety of environments and organisms, from bacteria to man; in addition, they represent one of most important sources of parasitic diseases. Every year, more than one million people die from complications from protozoal infections worldwide [1-5]. Of the medically relevant protozoa, Trypanosomatidae and Apicomplexa constitute a substantial group including the causative agents of several human diseases such as Chagas disease, sleeping sickness, leishmaniasis, malaria and toxoplasmosis [1,5,6]. The life cycles of these parasites are highly complex, involving different hosts and different specific interactions with a variety of cells and tissues [7- 11]. Some of these parasites live in the extracellular matrix or blood of host mammals, but the majority of them infect host cells to complete their cycle. Despite the high infection and mortality rates of these protozoa, especially in low-income populations of developing regions such as Africa, Asia and the Americas, current therapies for these parasitic diseases are very limited and unsatisfactory. The development of efficient drugs is urgently necessary, as are serious public health initiatives to improve patients' quality of life [12-16].

The Trypanosomatidae family belongs to the order Kinetoplastida and is comprised of flagellated protists characterised by the presence of the kinetoplast, a DNA-enriched portion of the mitochondrion localised close to the flagellar pocket. The most studied pathogenic trypanosomatids are the following: (a) *Trypanosoma brucei*, which is responsible for sleeping sickness in Africa; (b) *T. cruzi*, which is the causative agent of Chagas disease in Latin America; and (c) a variety of *Leishmania* species that cause leishmaniasis in tropical and subtropical areas worldwide. These illnesses have been classified by the World Health Organization as neglected diseases, which affect people living in poverty in developing countries and for which no efficient therapy is available [17-19].

The Apicomplexa family encompasses a large group of protists, including approximately 5,000 known parasitic species, which are characterised by the presence of an apical complex containing a set of organelles involved in the infection process. Apicomplexan parasites infect invertebrate and vertebrate hosts, including humans and other mammals. The most serious parasitic disorder is caused by apicomplexan *Plasmodium* species, the etiological agent of malaria, which causes more than one million deaths annually [1]. Toxoplasmosis is another important disease caused by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*; it has been estimated that almost half of the human population worldwide is infected with this protozoa [20]. The life cycle of the apicomplexan parasites generally consists of complex asexual and sexual reproduction, but some differences are observable among distinct genera. Malaria transmission occurs during the blood feeding of the *Anopheles* mosquito, whereas toxoplasmosis is mainly transmitted by the ingestion of raw meat or contaminated cat feces.

Autophagy is a physiological self-degradative pathway essential for the maintenance of the metabolic balance in eukaryotes, leading to the turnover of cellular structures during both the normal cell cycle and during conditions of stress, such as starvation [21,22]. This process depends on double-membrane vesicles known as autophagosomes, which are responsible for the engulfment of macromolecules and organelles and the recycling of their components without an inflammatory response [23]. In eukaryotic cells, proteins known as Atgs contribute to the formation of autophagosomes and their targeting to lysosomes [24]. The autophagic machinery interfaces with many cellular pathways, such as that of the immune response and the inflammatory process, and acts as an inductor or suppressor of these processes [25]. Some molecules and organelles can undergo autophagy by specific proteins, such as in the selective pathway known as xenophagy, which is also observed in the degradation of intracellular pathogens [26,27]. The involvement of autophagy in this process has been demonstrated in the interactions of different pathogens with the host cells [28-30]. In protozoan infections, the role of autophagy has been debated in light of conflicting evidence presented in the literature, which tends to vary with the experimental model. Some studies suggest that parasites evade host cell defences using autophagy, while others suggest that the host uses autophagy to eliminate the pathogen [31-35]. However, there is no doubt that the autophagic machinery decisively influences the pathogenesis and virulence of protozoan infections; this machinery may therefore represent a promising target for drug discovery [36]. The autophagic process also occurs in the protozoa [37,38] and could occur in parallel to the host cell pathway, thus increasing the complexity of the phenomena. In the following sub-sections, the biology of

Trypanosomatidae and Apicomplexa protozoa will be reviewed in relation to the role of autophagy during the infection of the host cells.

## 2. Trypanosomatids and autophagy

As previously mentioned, the transmission of neglected diseases caused by trypanosomatids (sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis) depends on an insect vector, and the environmental change from one host to another is a drastic event for the protozoa. To complete its life cycle, many metabolic and morphological changes must occur for the parasite to survive in a new host [39-42]. In addition to the kinetoplast, other characteristic ultrastructural structures are present in these parasites, including a single mitochondrion, unique flagella, sub-pellicular microtubules, glycosomes, acidocalcisomes and reservosomes (the last one is present exclusively in *T. cruzi*) [8]. In the context of the remodelling of sub-cellular structures, autophagy is greatly involved in eukaryotic homeostasis (including in that of trypanosomatids). However, the deregulation of this pathway, which is induced by conditions of stress, also leads to the parasite's death (Table 1). The sequencing of the complete genome of trypanosomatids has enabled the identification of parasitic genes [43-45]. Blast analysis comparing the trypanosome genome with yeast and mammalian genomes, with a particular emphasis on genes encoding autophagic machinery, has indicated the presence of some *ATG* genes in trypanosomatids [46,47]. However, the partial lack of a ubiquitin-like system, which is crucial for autophagosome formation, and the absence of cytoplasm-to-vacuole-targeting pathway orthologs suggest that these parasites have alternative autophagic features.

## 3. *T. brucei*

*T. brucei* is the etiological agent of sleeping sickness (or African trypanosomiasis) and is transmitted by the infected tsetse fly (*Glossina* sp.). After a blood feeding, procyclic trypomastigotes migrate from the insect midgut to the salivary gland where they undergo differentiation to infective metacyclic forms. Subsequently, these metacyclic trypomastigotes are inoculated into the mammalian host during the blood meal of the fly and differentiate into a proliferative bloodstream slender form. Interestingly, after a new differentiation, adapted short-stumpy forms evade the host immune system and disseminate the infection to the whole body; these forms are also able to cross the blood-brain barrier, which causes severe behavioural abnormalities, such as somnolence during daytime [48] (Figure 1). Unlike all other pathogenic trypanosomatids, which have an intracellular life-stage, *T. brucei* remains in the bloodstream of the mammalian host throughout the process of infection and, as such, is exposed to different environmental conditions that can trigger autophagy.

### 3.1. Role of autophagy in *T. brucei*

The first report on this parasite and autophagy was published in the 1970s by Vickerman and colleagues. These authors described the presence of myelin-like structures in different forms

of the parasite observed by transmission electron microscopy [49, 50]. Many years later, it was suggested that the autophagic pathway is involved in the turnover of glycosomes during protozoan differentiation [51]. Glycosomes are peroxysome-like organelles that perform early glycolytic steps and are also involved in lipid metabolism. It was demonstrated that glycosome contents are altered depending on the form of the parasite, with many of these organelles being close to glycosomes during the differentiation process. A similar phenomenon was observed after nutrient deprivation of the parasite, reinforcing the fact that differentiation may cause the degradation of glycosomes by pexophagy.

Further genomic and bioinformatic analyses were performed that identified in *T. brucei* many ATG orthologs to those of yeasts and mammals [47,52]. These genes are involved in different steps of the autophagic pathway, such as induction (*ATG24*, *PEX14*, *TOR1* and *TOR2*, *VAC8*), vesicle nucleation (*ATG6*, *VPS15* and *VPS34*) and vesicle expansion and completion (*ATG3*, *ATG7*, *ATG9*, two isoforms of *ATG4* and *ATG8*). Two isoforms of Atg4 and two of Atg8 were recently characterised structurally [53], and it was postulated that Atg8.2 is essential for autophagosome formation and that Atg8 depletion is associated with delayed cell death [54].

It is thought that many drugs may trigger autophagy in African trypanosomes. Dihydroxyacetone (DHA), spermine (snake venom) and vasoactive intestinal peptide (VIP – a neuropeptide secreted by the immune system) induce the appearance of morphological features of autophagy in *T. brucei* [55-58]. DHA is an interesting compound to be used in therapy for sleeping sickness because its phosphorylation is DHA kinase-dependent, and DHA kinase is present in mammals and other eukaryotes but not in trypanosomes. After DHA uptake, this compound is not eliminated, leading to typical morphological characteristics of autophagy similar to those found in rapamycin treatment. In another report [59], the authors showed that hydrogen peroxide can produce the appearance of autophagic profiles, suggesting that the release of reactive oxygen species acts as a signal in the autophagic pathway in *T. brucei*, as it does in other eukaryotic cells [60-62].

#### 4. *T. cruzi*

*T. cruzi* is the causative agent of Chagas disease. It is mainly transmitted by triatomine bugs, which are commonly known as “kissing bugs”. In the insect midgut, proliferative forms of the parasite called epimastigotes differentiate to metacyclic trypomastigotes after migration to the posterior intestine. During the blood meal, triatomines eliminate urine and feces with infective trypomastigotes that then gain access to the vertebrate bloodstream. After internalisation in the host cell, trypomastigotes remain in parasitophorous vacuoles (PV) that fuse with lysosomes, allowing an acidification of this compartment, which is an essential step towards differentiation into proliferative amastigotes. In the cytosol, successive parasite cycles occur until a new intracellular differentiation to trypomastigotes occurs; it is these forms that are responsible for the infection and dissemination to other cells and tissues [8] (Figure 2).



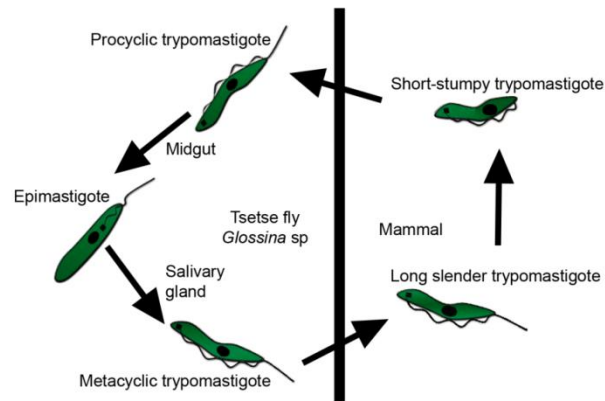


Figure 1. *T. brucei* life cycle.

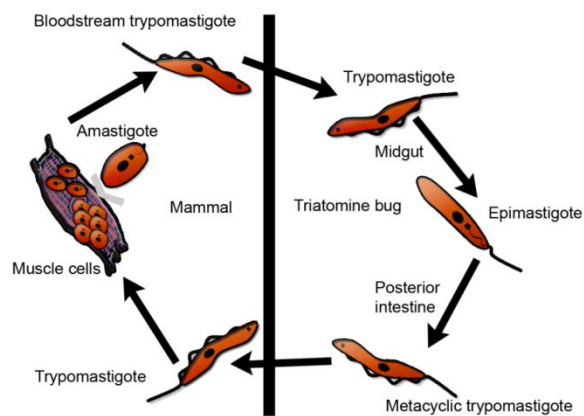


Figure 2. *T. cruzi* life cycle.

#### 4.1. Role of autophagy in *T. cruzi*

Ultrastructural evidence of autophagy in *T. cruzi* was observed after the treatment of epimastigotes and bloodstream trypomastigotes with drugs; the appearance of myelin-like figures was the most recurrent feature detected [63-67]. Recently, the synergistic combination of amiodarone and posaconazole was able to trigger autophagy in replicative amastigotes [68].

In this way, different classes of therapeutic agents are able to induce the formation of autophagosomes, an event associated with parasite-related autophagic cell death, being the interplay between other programmed cell death as apoptosis or necrosis not discarded [69]. Due to the limitations of cell models, previous studies of different parasite forms have employed alternative techniques, such as monodansylcadaverine (MDC) staining and ATG gene expression, to demonstrate autophagy in the parasite [66,67]. Unfortunately, *T. cruzi* molecular machinery does not allow the use of double-stranded RNA to knock down target RNAs [70]; in addition, the lack of recognition of protozoan proteins by anti-Atg commercial antibodies hampers the evaluation of autophagy in this parasite. In spite of the advances in molecular and cellular biology, transmission electron microscopy remains a gold standard for autophagy analysis [71,72].

Aside from the description of autophagosomes in all *T. cruzi* life stages, description of the Atg cascade involved in autophagosome formation is not complete. Almost all *T. brucei* ATG genes have ortholog genes in *T. cruzi* [37,47]. In this parasite, two isoforms of Atg8 were described, with only Atg8.1 localised in autophagosomes as expected. These data suggest that there is only partially shared autophagic machinery, as is observed in human Atg8 orthologs [37]. In another study [37], the authors described the participation of *T. cruzi* Atg4 and Atg8 isoforms under conditions of nutritional stress and in the differentiation process from epimastigotes to metacyclic trypomastigotes, a process known as metacyclogenesis. The authors observed a remarkable expression of Atg8.1 by immunofluorescence microscopy, which was suggestive of intense autophagy in differentiating epimastigotes. Moreover, Atg8 co-localised with reservosomes, which are pre-lysosomal compartments related to energy supply that are present only in epimastigotes [73,74]. The reservosomal content consumed during metacyclogenesis and the presence of Atg8 in this organelle strongly suggest that there is crosstalk between autophagy and reservosomes [75,76]. Transmission electron microscopy studies have produced images from endoplasmic reticulum profiles surrounding reservosomes that indicate the possible origin of preautophagosomal structures [66]. It is well known that PI3K inhibitors, such as 3-methyladenine and wortmannin, prevent autophagy in different experimental models [54,66]; however, these data are controversial due to a previous report demonstrating that treatment with kinase inhibitors staurosporine, genistein, 3-methyladenine and wortmannin led to the formation of autophagosomes [77]. The data indicate the necessity of careful use of PI3K inhibitors to block autophagy and the urgent need for the development of new specific autophagic inhibitors [78].

#### 4.2. Host cell autophagy and *T. cruzi* infection

Though thought to be essential for parasite success, lysosomal fusion could be involved in autophagy during host cell interaction and might contribute to the process of degradation and elimination of *T. cruzi*. In 2009, the role of autophagy in parasite entry and co-localisation with the PV was described, resulting in increased infection of Chinese hamster ovary cells; this observation was subsequently confirmed in macrophage and heart cell lineages [34,79]. Starvation conditions and the addition of rapamycin led to an increase in the scale of the infection; this increase was partially reversed by 3-methyladenine, wortmannin and vinblas-

tine, suggesting that autophagy favours the parasite during *T. cruzi*-host cell interactions. However, other groups demonstrated that classical autophagic stimuli (nutritional stress and rapamycin) did not produce an increase in parasite proliferation or even in the number of infected cells [33]. Recently, studies have emphasised role of autophagy in the control of *T. cruzi* infection using different cells and parasite strains (Figure 3) [80,81]. Once more, the conflicting data presented in the literature need to be further debated in light of the complexity of the protozoal strains and host cell models employed.

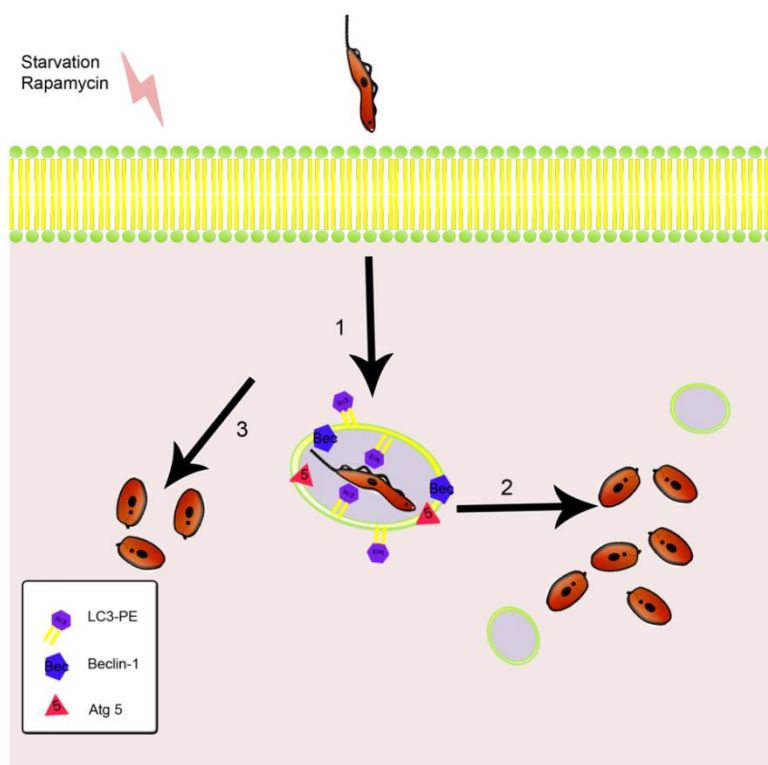
## 5. *Leishmania* species

The other medically important trypanosomatids are *Leishmania* species. Leishmaniasis is transmitted to mammals by sandflies, mainly of the *Phlebotomus* and *Lutzomia* genuses. Amastigotes differentiate into replicative procyclic promastigotes in the digestive tract of these sandflies, proliferate in the Phlebotominae gut, and then migrate to the proboscis where a new differentiation occurs to metacyclic promastigotes, the infective forms of the parasite. During the sandflies' blood meals, metacyclic promastigotes are inoculated into mammalian tissue and are phagocytised by macrophages. Inside the host cells, promastigotes differentiate into amastigotes that replicate and are responsible for cell lysis and dissemination in the organism (Figure 4). Currently, more than 20 species of *Leishmania* are known, each causing different clinical manifestations of the disease, including cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis (or Kala-azar). The pathogenicity depends on the *Leishmania* species and the host's immune response [8].

### 5.1. Role of autophagy in *Leishmania* sp.

Many groups have investigated autophagy cell death induced by drugs or antimicrobial peptides in various *Leishmania* species using electron microscopy and MDC staining [82-89]. Bioinformatics analysis has been a crucial checkpoint in the characterisation of *ATG* and *TOR* pathways in trypanosomatids [38,47,90]. In 2006, the role of autophagy in the differentiation process of *L. major* and *L. mexicana* was first evaluated [38,90]. The authors developed *L. major* VPS4, a mutant that could not complete the differentiation to the infective forms due to interference in autophagosome formation during conditions of starvation. The increase in Atg8 expression in differentiating forms supports the hypothesis that autophagy plays a pivotal role in metacyclogenesis [38,91]. In *L. mexicana*, the lack of cysteine peptidases CPA and CPB impairs autophagosomes formation and parasite differentiation; this finding is corroborated by the results of wortmaninn treatment and *ATG* deletion [90].

Recently, a subunit of protein kinase A in *L. donovani* that interferes with autophagy and protozoa differentiation was identified [92]. As observed in other trypanosomatids, the presence of Atg8-like proteins and their association with Atg4 in *Leishmania* species indicates that these proteins play a role in vesicle expansion [93]. Interestingly, the Atg5-Atg12 complex involved in autophagosome elongation was not previously detected [47], but recent studies have demonstrated its existence. It has also been shown that Atg5 deletion severally affects

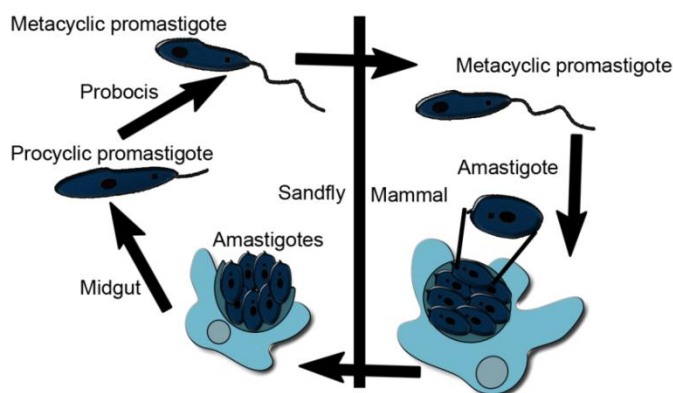


**Figure 3.** Autophagy in *T. cruzi*-host cell interaction. Romano et al [34] showed the co-localization of parasite vacuole with Atg proteins in the beginning of infection (1). Moreover, the replication of amastigotes is the same with or without autophagy induction (2) [33,34]. Rapamycin and starvation control infection reducing the number of amastigotes per cell (3) [80,81].

parasite homeostasis, producing a phenotype characterised by mitochondrial disruption, phospholipid accumulation and abnormal promastigote morphology [93,94]. Table 1 summarises the autophagic events in the three pathogenic trypanosomatids described in this chapter.

## 5.2. Host cell autophagy and *L. amazonensis* infection

The connection between the endosomal/lysosomal pathway and the PV results in macromolecules being taken up by the parasite, as demonstrated in *T. cruzi* infection [96]. In this context, a notable increase in the proliferation of *L. amazonensis* amastigotes was observed after autophagic induction by nutritional deprivation, rapamycin treatment or interferon-gamma. This mechanism was partially reversed by the autophagic inhibitors wortmaninn or 3-methyladenine, which significantly reduced amastigote replication (Figure 5) [33]. However,



**Figure 4.** *Leishmania* sp. life cycle.

a recent report presented no correlation between the increase in LC3 expression and heightened *L. amazonensis* infection after treatment with autophagy inducers and inhibitors. In addition, macrophage autophagy was observed in inflammatory infiltrates of *L. amazonensis*-infected mice [97] and in natural human *L. donovani* infection [98].

## 6. Apicomplexa and autophagy

The phylum Apicomplexa comprises one of the most medically relevant groups of protists, which cause serious health and economic problems. Among these parasites, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* species are well-known apicomplexans; it is estimated that malaria caused by *P. falciparum* kills over a million people annually. Another widespread disease is toxoplasmosis, which is caused by the apicomplexan parasite *T. gondii*; the severity of disease caused by this organism is directly related to patients' immunosuppression and is characterised by congenital transmission. In this context, knowledge of the detailed mechanisms involved in parasite infection and survival, including the role of autophagy, could contribute important information to the development of novel strategies for controlling Apicomplexa infections. Autophagy is an evolutionarily conserved pathway found in all eukaryotes, from unicellular organisms to metazoans; orthologs for approximately 30% of autophagy-related genes have been detected in apicomplexan sequenced genomes [99].

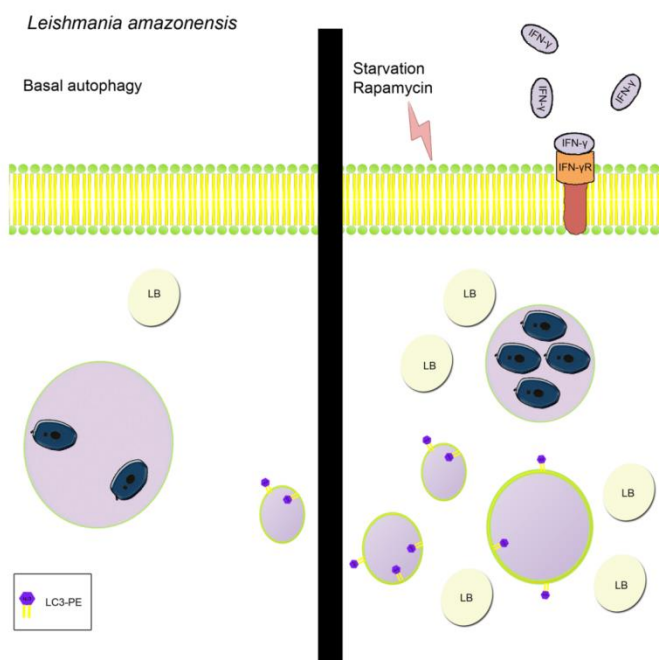
Among the key molecules involved in early autophagy steps, Atg1/ULK complex, Atg8 and Atg9 play crucial roles in cargo selectivity and in autophagosome formation [100,101]. Unlike other cell models, in Apicomplexa protozoa, the Atg8 C-terminal appears to not undergo processing before its association with phosphatidylethanolamine (PE) in the membrane of

Parasite	Life-stage	Phenotype	Stimuli	References
<i>T. brucei</i>	bloodstream trypomastigotes	autophagic cell death	DHA, neuropeptides, rapamycin, starvation	[55,58, 59]
	procyclic trypomastigotes	autophagic cell death	spermine (snake venom)	[57]
		Autophagy-induced differentiation	rapamycin, starvation	[54,56]
		unfolded protein response in endoplasmic reticulum associate with autophagy	DTT	[95]
<i>T. cruzi</i>	epimastigotes, trypomastigotes	autophagic cell death	SBIs; LPAs and cetoconazole; naphthoquinones; naphthoimidazoles; MBHA; posaconazole and amiodarone	[63-65,67, 68,71,72,]
	metacyclic trypomastigotes	Autophagy-induced differentiation	starvation; differentiation medium	[37]
<i>L. amazonensis</i>	promastigotes, amastigotes	autophagic cell death	amiodarone; elatol; lipophilic diamine	[83,86,89]
<i>L. chagasi</i>	promastigotes	autophagic cell death	yangambin	[87]
<i>L. donovani</i>	promastigotes	autophagic cell death	antimicrobial peptides; cryptolepine	[82,88]
<i>L. major</i>	promastigotes, amastigotes	autophagic cell death	cathepsin inhibitors	[85]
	metacyclic promastigotes	autophagy induces differentiation	differentiation medium; starvation	[38,91]
<i>L. donovani</i>	metacyclic promastigotes	autophagy induces differentiation	differentiation medium; starvation	[90]

**Table 1.** Summary of autophagic events in trypanosomatids. DHA: Dihydroxyacetone; DTT: dithiothreitol; SBIs: sterol biosynthesis inhibitors; LPAs: lysophospholipid analogues; MBHA: Morita-Baylis-Hillman adduct.

autophagosomes, suggesting a different regulation of this Atg protein in these organisms than in mammals and fungi [102]. Using a technique to detect lipidated Atg8 in *Plasmodium* species, only a single band corresponding to ATG8 was observed, suggesting that this parasite's Atg8 exists predominantly in the PE-conjugated form [22].

Two important kinases have opposing roles in the autophagic process: TOR (target of rapamycin) and class III phosphatidylinositol3-kinase (PI3K) [78,103]. In well-established autophagic models, TOR and class III PI3K represent negative and positive regulators, respectively, that act through complexes with regulatory subunits orchestrated by signalling cascades.



**Figure 5.** Autophagy in *L. amazonensis*-host cell interaction. When autophagy is induced, more amastigotes replicate and PV is smaller than in basal autophagic cells. Also, more lipid bodies are present, increasing infection and signaling to replication [33,97].

Analysis of the *T. gondii* genome revealed the presence of TOR and PI3K but not of other proteins crucial to the formation of these complexes [99]. Curiously, no genes for TOR complex machinery were found in the *Plasmodium* genome. Thus, it is possible that these unicellular eukaryotes have specific unknown proteins for several steps of the autophagic pathway instead of an absence of key proteins [22,104].

## 7. *T. gondii*

*T. gondii* is an obligate intracellular parasite with a complex life cycle involving one definitive feline host where the sexual phase occurs and intermediate hosts, such as birds, other mammals and man [105]. The main transmission routes to humans are the following: (i) the ingestion of raw meat containing tissue cysts (essentially bradyzoites forms); (ii) the ingestion of water and food contaminated with feline feces residue containing oocysts; and (iii) transplacental pathway of tachyzoites [106]. After oral ingestion, tissue cysts or oocysts rupture, liberating the slow-replicating forms known as bradyzoites and sporozoites, respectively, which then

invade intestinal epithelial cells. In the intracellular environment, the parasites differentiate into the fast-replicating tachyzoites that proliferate inside the host cell PV. The sustained infection depends on the modification of the PV membrane by the insertion of *T. gondii* secreted proteins, which prevent the fusion to lysosomes and, consequently, the elimination of the parasite (Figure 6) [20,107].

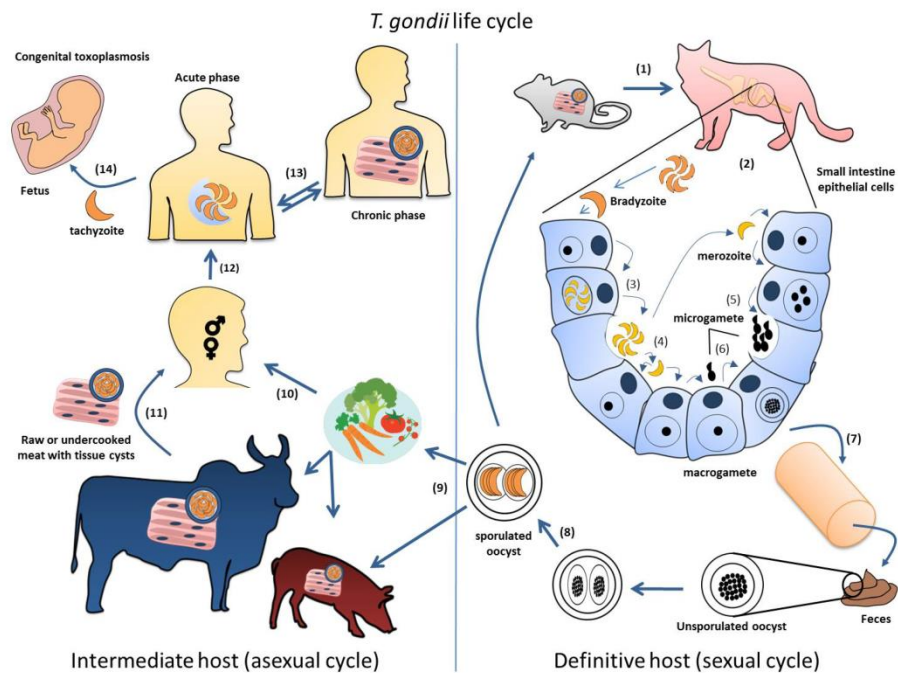
In healthy adults, *T. gondii* cysts are established in the host cells mainly in the eyes, brain and muscles during the chronic phase of toxoplasmosis [108]; however, in immunocompromised patients, such as HIV-positive patients, or in congenital toxoplasmosis, the disease becomes much more severe, and its complications could lead to death [20,109,110]. Despite the high percentage of people infected, the available therapy for toxoplasmosis is effective only in the tachyzoite stage and presents limited efficacy against the tissue cyst, which is the latent form of the parasite [111]. In this context, many efforts are necessary to develop new drugs to treat *T. gondii* infection [17].

### 7.1. Role of autophagy in *T. gondii* infection

Only a few studies on the *T. gondii* autophagic pathway have been performed, and these studies suggest opposing roles of autophagy in the parasite infection [102,112]. The presence of TgAtg8 in autophagic vesicles was observed in tachyzoites during their intracellular replication; similarly, severe parasite growth arrest due to TgAtg3 knockdown and recent identifications of the presence of TgAtg1 and TgAtg4 in the parasite suggest a role for autophagy in *T. gondii* homeostasis, although long-term exposure to autophagic stimuli was found to be harmful to the parasite (Figure 7) [112; 113].

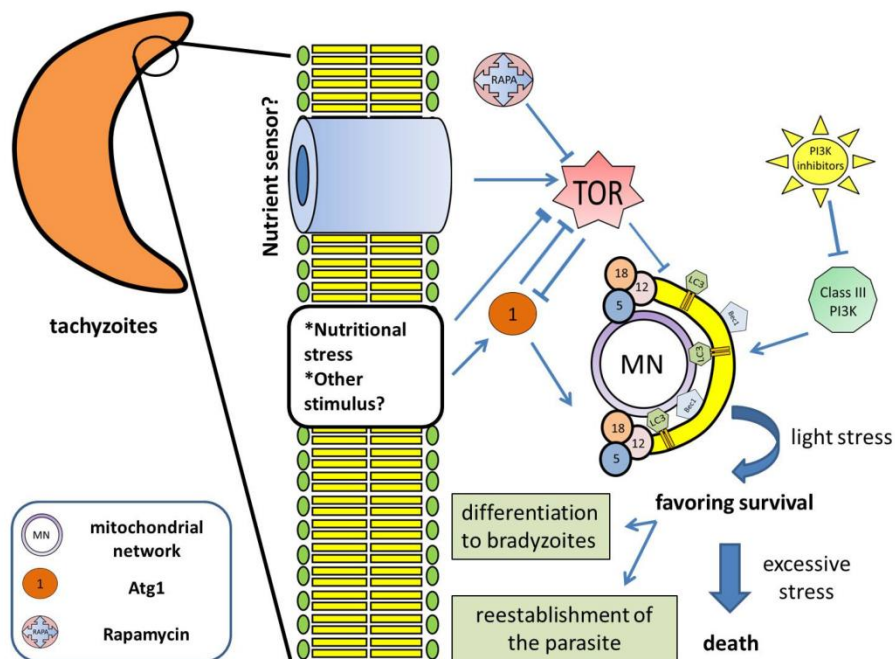
Tachyzoites divide by a process called endodyogeny, whereby two daughter cells are developed inside a mother cell and leave residual material at the end of division. During this process, autophagy might be involved in recycling the mother cell organelles, such as micronemes and rhoptries, which are synthesised de novo in the daughter cells; however the accumulation of organelles after endodyogeny has not been observed in TgATG3 knockout organisms, making other experiments necessary to confirm this hypothesis [113]. One important phenotype detected in autophagic mutants is the loss of mitochondrial integrity [102,112]. Mitophagy, which is the autophagy of mitochondria, regulates the mitochondrial number to match metabolic demand; this process represents a quality control that is necessary for the removal of damaged organelles [114]. Autophagic stimuli are able to direct the mitochondrial network of tachyzoites towards their autophagic pathway, but the molecular machinery involved in selective targeting of the organelle remains unclear [102,112]. Nutrient deprivation has been shown to be a classic stimulus for the autophagic pathway activation in a large variety of organisms [37,115]. In *T. gondii* tachyzoites, starvation induces autophagy in extracellular and intracellular parasites [102,112]. Furthermore, autophagosomes were observed in parasites after a long extracellular nutritional restriction, suggesting that autophagy can act as a mechanism of resistance to starvation for nutrient recycling until the infection of a new host cell [102].





**Figure 6.** *T. gondii* life cycle. (1) Definitive host infection; (2) Cyst disruption and intestinal epithelial cell infection; (3) Formation of merozoites; (4,5) Start of sexual phase with the formation of macrogametes and flagellate microgametes from merozoites; (6) Fusion of microgamete and macrogamete; (7) Oocyst release to the environment in the faeces; (8) The unsporulated oocysts become infective and contaminate the environment [116-118]; (9) The sporulated oocysts can cause infection of animals via consumption of contaminated food and water. (10,11) Human infection occurs by the ingestion of raw or undercooked meat of infected animals containing *T. gondii* cysts; (12) *T. gondii* tachyzoite multiplication in the intermediate host; (13) Tachyzoite-bradyzoite differentiation and formation of tissue cysts; (14) Transplacental transmission of tachyzoites.

The data presented here demonstrate possible functions of *T. gondii* autophagy in parasite homeostasis. However, it has been proposed that, when strongly induced, the autophagic pathway represents a self-destructive mechanism leading to protozoal death. The molecular pathway of autophagic cell death is still unknown, and it is debated whether the pathway is a type of programmed cell death or a survival response to death stimuli [119]. Intracellular starved tachyzoites showed systematic mitochondrial fragmentation and a defect in host cell internalisation. As *T. gondii* is an obligate intracellular protozoa, the loss of invasion capacity leads to parasite death. The impairment in infective ability was related to the loss of mitochondrial integrity because organelles from apical complexes, such as rhoptries and micronemes, which are usually associated with the invasion process, are intact in these parasites [112]. Interestingly, these authors also demonstrated that autophagic inhibitor 3-methylade-



**Figure 7.** *T. gondii* tachyzoites response to autophagic stress. Autophagy acts in survival or death mechanisms in apicomplexan parasites depending on the environmental stress conditions. Arrows: activation; Headless arrows: inhibition.

nine prevented mitochondrial fragmentation, suggesting autophagic involvement in *T. gondii* death.

While nutritional stress has been extensively used as a model for autophagy, this condition is not easily encountered in the host cells and tissues *in vivo*. However, parasites could be exposed to nutritional restriction in the extracellular environment. The viability of tachyzoites kept in an axenic medium for periods of up to 12 hours drastically decreases, but a significant number of parasites nevertheless differentiate into bradyzoites [120]. Indeed, these observations raise the hypothesis that autophagy could be an adaptive mechanism of *T. gondii* to survive for short periods in starvation conditions, allowing the parasite to recover when favourable conditions occur or even to differentiate into a cystic form. Another interesting point for discussion is the correlation between mitochondrial fragmentation in intracellular tachyzoites and the depletion of amino acids in the culture medium [112]. Activated macrophages infected with the parasite showed low availability of the essential amino acid tryptophan, a condition that directly contributes to the protozoa's death in these cells [121,122]. In this context, TOR kinase is a vital component of the amino acid sensing mechanism in eukaryotic cells, as suggested by

the detection of TgTOR by bioinformatic approaches and the evaluation of the activity of the classical TOR inhibitor rapamycin. This inhibitor triggered mitochondrial fragmentation of intracellular tachyzoites in starved parasites, and this phenotype was reversed by adding 3-methyladenine [112].

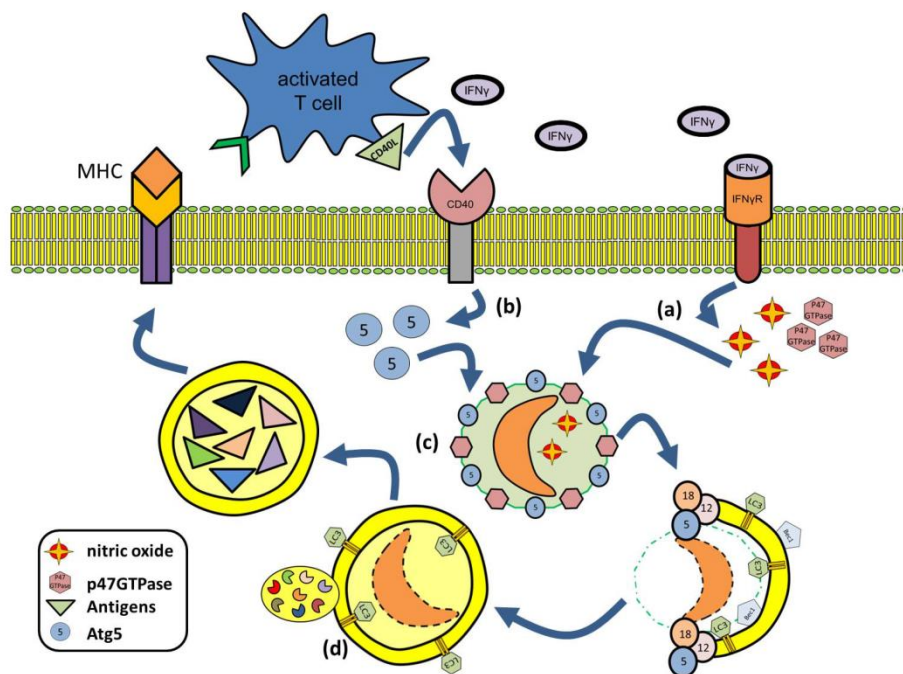
## 7.2. Host cell autophagy and *T. gondii* infection

As previously mentioned, *T. gondii* can infect any nucleated cell, but the parasite tropism principally involves nervous and muscular cells where the establishment of cystic forms is observed in chronic toxoplasmosis [111,123]. As was observed for *T. cruzi*-host cell interactions, controversial data on the importance of autophagy during *T. gondii* infection have been described in the literature; indeed, it has been suggested that autophagy can either control or facilitate parasite internalisation and proliferation [32,35,124-128]. Despite the relevance of muscular and nervous cells for the establishment of infection and for the course of the disease, very little has been reported on the role of autophagy in the progression of infection. As we will discuss in the next paragraphs, previous studies on the connection between the autophagic pathway and *T. gondii* infection were performed in macrophages, which are cells that play an important role in the immune response against this parasite [129].

Previous reports have shown that cellular immunity mediated by CD40 stimulation redirects the *T. gondii* to a lysosomal compartment via the autophagic route, resulting in the antimicrobial activity of the macrophage *in vitro* and *in vivo* [124,125]. *In vivo*, parasite elimination was dependent on GTPase p-47, IFN- $\gamma$ , IGTP, and PI3K and culminated in the rupture of the parasite's membrane [125] (Figure 8). Additionally, the relationship between autophagy and the fusion of lysosomes with the *T. gondii* PV seems to be dependent on the synergy between TRAF6 signalling downstream of CD40 and TNF- $\alpha$  [126]. However, the IFN- $\gamma$ /p47 GTPase-dependent elimination of the parasite by macrophages is independent of CD40/TNF signalling *in vitro*, demonstrating the primary role of IFN- $\gamma$  in immunity against *T. gondii* in mice [127]. As observed in astrocytes, autophagy is activated to eliminate intracellular parasite debris and thus prevent the host cell death. Investigations in macrophages also indicated that the CD40-p21-Beclin 1 pathway is a CD40-dependent immunity route to mediating *in vivo* protection [128]. Similarly, Atg5 is required for damage to the PV membrane and removal of the parasite in primary macrophages stimulated by IFN- $\gamma$ , despite the fact that no autophagosomes involving *T. gondii* have been detected. Atg5 also appeared crucial for *in vivo* p47 GTPase IIGP1 recruitment to the vacuole membrane induced by IFN- $\gamma$ , suggesting an additional autophagy-independent role for Atg5 in the GTPase trafficking process [32]. In *T. gondii* infected astrocytes, the participation of autophagy has been shown to be indirect. The IFN- $\gamma$ -stimulation of astrocytes infected with tachyzoites triggers the recruitment of p47 GTPases to the PV and usually leads to rupture of the vacuole and parasite membrane. In this case, autophagy acts by removing protozoal debris that accumulates in the cytoplasm and causes cell injury. Additionally, autophagy assists in antigen presentation through MHC class II in astrocytes, allowing an intracerebral immune response to parasite [130].

So far, little has been described regarding the involvement of autophagy in the interaction of *T. gondii* with nonprofessional phagocytes. In primary fibroblasts or Hela cells, infection with

tachyzoites induced LC3 conjugation to PE, accumulation of LC3-containing vesicles close to the PV and an overexpression of beclin-1 and phosphatidylinositol-3-phosphate in the host cells in the mTOR-independent pathway. The infection of Atg5-deficient fibroblasts was reduced in physiological concentrations of amino acids, reinforcing the host cell autophagic role in the recovery of nutrients by the parasite. Because the classical function of autophagy involves recycling of various cellular components and because *T. gondii* depends on the uptake of many nutrients from the host cell, it has been proposed that the parasite may take advantage of the mammalian autophagic machinery to achieve successful infection [35]. Table 2 shows the host autophagic roles during *T. gondii* infection.



**Figure 8.** Autophagic role in *T. gondii* interaction with professional phagocytic cells. (a) INF- $\gamma$  recruits P47GTPases to the PV membrane and induce nitric oxide production which limits the parasite replication. (b) CD40L activates Atg5 and recruits the autophagic machinery to the PV membrane. (c) PV and parasite membrane degradation by P47GTPase and Atg5. (d) Elimination of *T. gondii* debris by autophagolysosomal fusion and possible contribution of this process in antigen presentation through class II MHC.

Host cell	Induction	Phenotype	Reference
Peritoneal Macrophages and RAW264.7 lineage	CD40 stimulation and rapamycin	accumulation of LC3 around PV and low parasite load	[124]
Peritoneal macrophages	INF- $\gamma$ stimulation	autophagy- dependent elimination of intracellular parasite debris	[125]
Peritoneal macrophages	INF- $\gamma$ stimulation	Atg5-dependent PV membrane disruption	[32]
bone marrow Macrophages	CD40-p21-Beclin 1 pathway	stimulation of autophagy for protection against <i>T. gondii</i>	[128]
astrocytes	INF- $\gamma$ stimulation	<i>T. gondii</i> debris removal by autophagy after vacuole and parasite membrane rupture by p47 GTPases	[130]
primary fibroblasts and Hela cells	<i>T. gondii</i> infection	Induction of LC3 conjugation to PE, accumulation of vesicles containing LC3 close to PV, beclin-1 and PI3K inside the cell	[35]

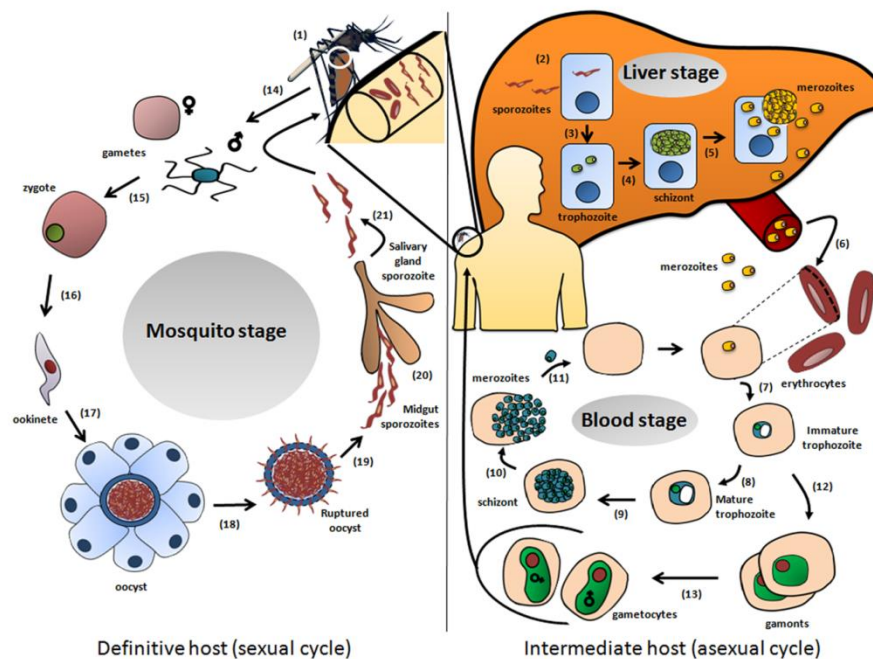
**Table 2.** Autophagy in *T. gondii*-host cell interactions

## 8. *Plasmodium* sp.

*Plasmodium* species are causative agents of malaria, the illness with the highest morbidity rate among human parasitic diseases. Currently, 5 species of *Plasmodium* sp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*) can infect humans, and lethality is associated with *P. falciparum* [131-133]. Sporozoites are transmitted by *Anopheles* sp. mosquitoes (definitive hosts) to the mammals (intermediate hosts), where they migrate primarily to the liver. After internalisation in hepatocytes, the parasites convert from elongated sporozoites (invasion competent and motile) to round proliferative trophozoites (metabolically active), which start the asexual reproduction process known as schizogony. At the end of the reproductive process, the daughter cells (merozoites) initiate maturation for erythrocyte invasion. When the merozoites become mature, they are enclosed in a membrane (the merosome) and released from hepatocytes to invade red blood cells, causing clinical symptoms of malaria (Figure 9). [135-137].

### 8.1. Role of autophagy in *Plasmodium* sp. infection

Recent publications have suggested that autophagy is involved in the differentiation of sporozoites to merozoites in hepatocytes [137,138]. The sporozoite-to-trophozoite differentiation is accompanied by the elimination of organelles unnecessary for schizogony and the production of merozoites in liver cells [137]. For example, micronemes and rhoptries are compartmentalised in the cytoplasm of sporozoites and sequestered in double-membrane structures resembling autophagosomes. In axenic conditions, the treatment of parasites with 3-methyladenine resulted in significant delay of the sporozoite differentiation process [139].



**Figure 9.** *Plasmodium* sp. life cycle. (1) Inoculation of sporozoites by malaria-infected female *Anopheles* mosquito into the human host. (2) Sporozoites infect hepatocytes. (3) Sporozoite-trophozoite differentiation. (4) Schizont formation. (5) Schizont rupture and release of merozoites. (6) Merozoites infect red blood cells. (7,8) Trophozoite maturation. (9) Schizont formation in red blood cells. (10) Schizont rupture and release of merozoites. (11) Infection of new red blood cells by the merozoites. (12,13) Differentiation of some parasites in gametocytes (sexual erythrocytic stages). (14) Ingestion of gametocytes by the mosquito during a blood meal. (15) Zygote formation in the mosquito's stomach when the microgametes penetrate the macrogametes. (16) Zygote-ookinete differentiation. (17) Ookinetes invade the midgut wall of the mosquito where they develop into oocysts. (18,19) Oocysts rupture and release sporozoites. (20) Sporozoites migrate to the mosquito's salivary glands. (21) Mosquito inoculates sporozoites into a new human, perpetuating the parasite cycle.

After sporozoite differentiation, Atg8 is present in autophagosomes during the replication phase, suggesting an additional independent role for this protein in autophagy [137, 138,140].

The involvement of autophagy in *Plasmodium*-infected red blood cells has been poorly studied. One study demonstrated that erythrocytes infected with *P. falciparum* trophozoites and maintained in supplemented culture medium expressed Atg8 in the parasite cytosol. However, when these infected cells are submitted to restriction of glucose and amino acids, an increase in the number of autophagosomes labelled by Atg8 was observed, and these vesicles were found close to red blood cell membranes. Once erythrocytes no longer have organelles in the cytoplasm, the potential targets of autophagosomes in this cell model are debated. One hypothesis suggested that these autophagosomes target haemoglobin and blood nutrients to

favour nutrient uptake by the parasite (Gaviria and colleagues, unpublished results). Surprisingly, no TOR ortholog was found in the *P. falciparum* genome (Sinai & Roepe, unpublished results), suggesting that under normal growth conditions, *P. falciparum* autophagy is configured as a survival process that is constitutively regulated by the acquisition of nutrients, although this route is unusual. Table 3 summarises the published reports on autophagic features in apicomplexans.

Little is known about the involvement of autophagy in the *Plasmodium sp.*-host cell interactions. So far, *Plasmodium ATG8* knock-out resulted in a lethal phenotype, indicating that this gene is essential for the mammalian life-stage of the parasite [22]. However, there have been no studies on the importance of the host cell autophagic machinery during the infection.

Parasite	Localisation	Induction	Phenotype	Reference
<i>T. gondii</i>	extracellular	Amino acid starvation	Basal: maintenance of life	[102]
	intracellular	Amino acid starvation and rapamycin	mitochondrial fragmentation	[111]
		Glucose and/or pyruvate starvation	Arrested mitochondrial fragmentation	
<i>Plasmodium sp.</i>	intracellular	sporozoite to trophozoite conversion in the liver	recycling of secretory organelles	[136]

**Table 3.** Autophagy in Apicomplexan parasites

## 9. Conclusion

The present chapter addresses the positive and negative regulations of the autophagic process of infected mammalian cells and the possible effects of these regulations on the *in vitro* and *in vivo* modulation of this process. This review also describes the autophagy pathway in pathogenic trypanosomatids and apicomplexans responsible for some of the most relevant neglected illnesses worldwide. The pivotal role of autophagy in pathogenicity and virulence was demonstrated in *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania sp.*, *T. gondii* and *Plasmodium sp.*, which suggests that autophagic machinery is a possible target for anti-parasitic intervention.

## Acknowledgements

This work was supported with grants from CNPq (Universal), FAPERJ (APQ1) and IOC/FIOCRUZ.

### Author details

Thabata Lopes Alberto Duque<sup>1,2</sup>, Xênia Macedo Souto<sup>1,3</sup>, Valter Viana de Andrade-Neto<sup>4</sup>, Vítor Ennes-Vidal<sup>5</sup> and Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto<sup>1\*</sup>

\*Address all correspondence to: rubemb@ioc.fiocruz.br

1 Laboratory of Cell Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2 Laboratory of Cell Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, MG, Brazil

3 Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

4 Laboratory of Biochemistry of Trypanosomatids, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

5 Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Thabata Lopes Alberto Duque and Xênia Macedo Souto equally contributed to this work

### References

- [1] Nayyar GML, Breman JG, Newton PN, Herrington J. Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa. *Lancet Infectious Diseases* 2012;12(6): 488-96.
- [2] Soeiro MN, De Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2009;13(1):105-21.
- [3] Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Current Medicinal Chemistry* 2012;19(10): 1443-74.
- [4] Welburn SC, Maudlin I. Priorities for the elimination of sleeping sickness. *Advances in Parasitology* 2012;79:299-337.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Toxoplasmosis. <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/> (accessed 17 october 2012).
- [6] World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases. Switzerland. 2010.



- [7] Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* 2007;64:1-109.
- [8] Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 2008;118(4): 1301-10.
- [9] Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation* 2008;118(4): 1266-76.
- [10] Boyle JP, Radke JR. A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models. *International Journal of Parasitology* 2009;39(8): 903-14.
- [11] Teixeira AR, Gomes C, Lozzi SP, Hecht MM, Rosa AeC, Monteiro PS, et al. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Cadernos de Saúde Pública* 2009;25 (1): S32-44.
- [12] Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006;5(11): 941-55.
- [13] Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008;2(9):e300.
- [14] Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs--current knowledge and future prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2008;23(5): 708-18.
- [15] Nissapatorn V, Sawangjaroen N. Parasitic infections in HIV infected individuals: diagnostic & therapeutic challenges. *The Indian Journal of Medical Research* 2011;134(6): 878-97.
- [16] Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012;6(2):e1475.
- [17] Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2009;51(5): 247-53.
- [18] Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. Neglected tropical diseases. *British Medical Bulletin* 2010;93: 179-200.
- [19] World Health Organization. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/) access in November 8, 2012.
- [20] Montoya JG, Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363(9425): 1965-76.

- [21] Kiel JAKW. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 2010;365: 819-830.
- [22] Brennand A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PAM. Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2011;177 (2): 83-99.
- [23] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *Clinical Investigation* 2005;115(10):2679-88.
- [24] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 2011; 27: 107-32.
- [25] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011;469(7330): 323-35.
- [26] Sumpter R, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2010;21(7): 699-711.
- [27] Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. Autophagy and the immune system. *Annual Review of Immunology* 2012;30: 611-46.
- [28] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6): 753-66.
- [29] Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host & Microbe* 2009;5(6): 527-49.
- [30] Skendros P, Mitroulis I. Host cell autophagy in immune response to zoonotic infections. *Clinical & Development Immunology* 2012;2012: 91052. doi: 10.1155/2012/910525. (accessed 17 October 2012).
- [31] Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infection & Immunity*. 2008;76(1): 278-88.
- [32] Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell host and Microbe* 2008;4(5): 458-69.
- [33] Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection* 2009;11(2): 181-90.
- [34] Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy* 2009;5(1): 6-18.

- [35] Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *The Journal of biological chemistry* 2009;284(3): 1694-1701.
- [36] Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, et al. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011;7(2): 127-58.
- [37] Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(6): 3454-64.
- [38] Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(16): 11384-96.
- [39] Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. 1995;111 (Pt 3): 275-87.
- [40] Nolan DP, Rolin S, Rodriguez JR, Van Den Abbeele J, Pays E. Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *European Journal of Biochemistry* 2000;267(1): 18-27
- [41] Gonçalves RL, Barreto RF, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2011;43(6): 651-61.
- [42] Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One*. 2012;7(5):e36591.
- [43] Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005;309(5733): 416-22.
- [44] El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005;309(5733): 409-15.
- [45] Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005;309(5733): 436-42.
- [46] Rigden DJ, Herman M, Gillies S, Michels PA. Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochemical Society Transactions* 2005;33(Pt 5): 972-4.

- [47] Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ. Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy* 2006;2(2): 107-18.
- [48] Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes C, Rassi A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2010;23(2): 324-49.
- [49] Brown RC, Evans DA, Vickerman K. Developmental changes in ultrastructure and physiology of *Trypanosoma brucei*. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene* 1972;66(2): 336-7.
- [50] Vickerman K, Tetley L. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* 1977;57(4-5): 441-57.
- [51] Herman M, Pérez-Morga D, Schtickzelle N, Michels PA. Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* 2008;4(3): 294-308.
- [52] Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A* 2008;105(38): 14579-84.
- [53] Koopmann R, Muhammad K, Perbandt M, Betzel C, Duszenko M. *Trypanosoma brucei* ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. *Autophagy* 2009;5(8): 1085-91.
- [54] Li FJ, Shen Q, Wang C, Sun Y, Yuan AY, He CY. A role of autophagy in *Trypanosoma brucei* cell death. *Cellular Microbiology* 2012;14(8): 1242-56.
- [55] Uzcátegui NL, Carmona-Gutiérrez D, Denninger V, Schoenfeld C, Lang F, Figarella K, et al. Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51(11): 3960-8.
- [56] Uzcátegui NL, Denninger V, Merkel P, Schoenfeld C, Figarella K, Duszenko M. Dihydroxyacetone induced autophagy in African trypanosomes. *Autophagy* 2007;3(6): 626-9.
- [57] Merkel P, Beck A, Muhammad K, Ali SA, Schönfeld C, Voelter W, et al. Spermine isolated and identified as the major trypanocidal compound from the snake venom of *Eristocophis macmahoni* causes autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Toxicon* 2007;50(4): 457-69.
- [58] Delgado M, Anderson P, Garcia-Salcedo JA, Caro M, Gonzalez-Rey E. Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell Death and Differentiation* 2009;16(3): 406-16.

- [59] Denninger V, Koopmann R, Muhammad K, Barth T, Bassarak B, Schönfeld C, et al. Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? *Methods in Enzymology* 2008;451: 373-408.
- [60] Zhang Y, Qi H, Taylor R, Xu W, Liu LF, Jin S. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy* 2007;3(4): 337-46.
- [61] Chen Y, Gibson SB. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* 2008;4(2): 246-8.
- [62] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences* 2011;36(1): 30-8.
- [63] Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, de Souza W. Effects of inhibitors of Delta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis* 2005;11(6): 506-15.
- [64] Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005;55(5): 780-4.
- [65] Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, de Castro SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. *Parasitology Research* 2007;101(4): 895-905.
- [66] Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ, et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2009;136(5): 499-510.
- [67] Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2012;139(1): 26-36.
- [68] Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JF, de Barros Moreira TL, de Carvalho TM, Urbina JA, et al. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012;40(1): 61-71.
- [69] Menna-Barreto RF, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 2009;40(2): 157-68.
- [70] DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004;133(2): 175-86.
- [71] Sandes JM, Borges AR, Junior CG, Silva FP, Carvalho GA, Rocha GB, et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile: A new highly active compound

- against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Chemistry* 2010;38(5): 190-5.
- [72] Benitez D, Pezaroglo H, Martínez V, Casanova G, Cabrera G, Galanti N, et al. Study of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis. *Parasitology* 2012 139(4): 506-15.
- [73] Soares MJ, Souto-Padrón T, De Souza W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science* 1992;102 (Pt 1): 157-67.
- [74] Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999;94 (1): 139-41.
- [75] Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *The Journal of Parasitology* 2000;86(6): 1213-8.
- [76] Alvarez VE, Kosec G, Sant Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy* 2008;4(3): 361-3
- [77] Braga MV, de Souza W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters* 2006;256(2): 209-16.
- [78] Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(2): 992-8.
- [79] Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life* 2012;64(5): 387-96.
- [80] Martins RM, Alves RM, Macedo S, Yoshida N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Cellular Microbiology* 2011;13(7): 943-54.
- [81] Maeda FY, Alves RM, Cortez C, Lima FM, Yoshida N. Characterization of the infective properties of a new genetic group of *Trypanosoma cruzi* associated with bats. *Acta Tropica* 2011;120(3): 231-7.
- [82] Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2003;127(1): 23-35.

- [83] Dos Santos AO, Veiga-Santos P, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Sudatti DB, Bianco EM, et al. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Marine Drugs* 2010;8(11): 2733-43.
- [84] Santos AO, Santin AC, Yamaguchi MU, Cortez LE, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, et al. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2010;104(6): 475-83.
- [85] Schurigt U, Schad C, Glowa C, Baum U, Thomale K, Schnitzer JK, et al. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54(12): 5028-41.
- [86] de Macedo-Silva ST, de Oliveira Silva TL, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Molecular Biology International* 2011; doi: 10.4061/2011/876021 (accessed 17 October 2012).
- [87] Monte Neto RL, Sousa LM, Dias CS, Barbosa Filho JM, Oliveira MR, Figueiredo RC. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology* 2011;127(1):215-21.
- [88] Sengupta S, Chowdhury S, Bosedasgupta S, Wright CW, Majumder HK. Cryptolepine-Induced Cell Death of *Leishmania donovani* Promastigotes Is Augmented by Inhibition of Autophagy. *Molecular Biological International* 2011;2011: 187850.
- [89] Silva AL, Adade CM, Shoyama FM, Neto CP, Padrón TS, de Almeida MV, et al. In vitro leishmanicidal activity of N-dodecyl-1,2-ethanediamine. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2012;66(3): 180-6.
- [90] Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology* 2006;61(3): 655-74.
- [91] ] Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 2007;37(10): 1063-75.
- [92] Bhattacharya A, Biswas A, Das PK. Identification of a protein kinase A regulatory subunit from *Leishmania* having importance in metacyclogenesis through induction of autophagy. *Molecular Microbiology* 2012;83(3): 548-64.
- [93] Williams RAM, Woods KL, Juliano L, Mottram JC, Coombs GH. Characterisation of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy* 2009;5(2): 159-172.
- [94] Williams RAM, Smith TK, Cull B, Mottram JC, Coombs GH. ATG5 is Essential for ATG8-Dependent Autophagy and Mitochondrial Homeostasis in *Leishmania major*. *Plos Pathogens* 2012; 8 (5): 1-14.

- [95] Goldshmidt H, Matas D, Kabi A, Carmi S, Hope R, Michaeli S. Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens* 2010;6(1):e1000731.
- [96] Schaible UE, Schlesinger PH, Steinberg TH, Mangel WF, Kobayashi T, Russell DG. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *Journal of Cell Science* 1999;112(Pt 5): 681-93.
- [97] Cyrino LT, Araújo AP, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. *In vivo* and *in vitro* *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue & Cell* 2012; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2012.08.003> (accessed 17 October 2012).
- [98] Mitroulis I, Kourtzelis I, Papadopoulos VP, Mimidis K, Speletas M, Ritis K. *In vivo* induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. *Parasitology International* 2009;58(4):475-7.
- [99] Besteiro S. Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan parasites? *Molecular and Biochemical Parasitology* 2012;184: 1-8.
- [100] Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular biology of the cell* 2008;19(8): 3290-8.
- [101] Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *Journal of cell science* 2008;121(Pt 16): 2685-95.
- [102] Besteiro S, Brooks CF, Striepen B, Dubremetz JF. Autophagy protein Atg3 is essential for maintaining mitochondrial integrity and for normal intracellular development of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS pathogens* 2011;7(12): e1002416.
- [103] Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 2008;4(7): 851-65.
- [104] Rigden DJ, Michels PA, Ginger ML. Autophagy in protists: Examples of secondary loss, lineage-specific innovations, and the conundrum of remodeling a single mitochondrion. *Autophagy* 2009;5(6): 784-94.
- [105] Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International journal for parasitology* 2008;38(11): 1257-78.
- [106] Furtado JM, Smith JR, Belfort R Jr., Gattley D, Winthrop KL. Toxoplasmosis: a global threat. *Journal of global infectious diseases* 2011;3(3): 281-4.
- [107] Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley, LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental parasitology* 1999;92(2): 87-99.
- [108] Sullivan WJ Jr., Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS microbiology reviews* 2012;36(3): 717-33.



- [109] Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitology today* 1993;9(2): 61-3.
- [110] Mele A, Paterson PJ, Prentice HG., Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone marrow transplantation* 2002;29(8): 691-8.
- [111] Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and public health* 2010;57(1): 1-7.
- [112] Ghosh D, Walton JL, Roepe PD, Sinai AP. Autophagy is a cell death mechanism in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology* 2012;14(4): 589-607.
- [113] Besteiro S. Role of ATG3 in the parasite *Toxoplasma gondii*: Autophagy in an early branching eukaryote. *Autophagy* 2012;8(3): 435-7.
- [114] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 2011;12(1): 9-14.
- [115] Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2004;36(12): 2445-62.
- [116] Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of protozoology* 1972;19(1): 155-7.
- [117] Dubey JP, Frenkel JK. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. *The Journal of parasitology* 1973; 59(3): 505-12.
- [118] Dubey JP. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of domiciled and stray cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1973; 162(10): 873-7.
- [119] Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell death and differentiation* 2012;19(1): 87-95.
- [120] Yahiaoui B, Dzierszinski F, Bernigaud A, Slomianny C, Camus D, Tomavo S. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 1999;99(2): 223-35.
- [121] Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81(3): 908-12.
- [122] Pfefferkorn ER, Eckel M, Rebhun S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Molecular and biochemical parasitology* 1986;20(3): 215-24.
- [123] Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews* 2000;64(3): 607-23.
- [124] Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste, CS. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fu-

- sion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *The Journal of clinical investigation* 2006;116(9): 2366-77.
- [125] Ling Y M, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, et al.. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *The Journal of experimental medicine* 2006;203(9): 2063-271.
- [126] Subauste CS, Andrade RM, Wessendarp M. CD40-TRAF6 and autophagy-dependent anti-microbial activity in macrophages. *Autophagy* 2007;3(3): 245-8.
- [127] Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS. Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. *Infection and immunity* 2007;75(10): 4799-803.
- [128] Portillo JA, Okenka G, Reed E, Subauste A, Van Grol J, Gentil K, et al. The CD40-autophagy pathway is needed for host protection despite IFN-Gamma-dependent immunity and CD40 induces autophagy via control of P21 levels. *PLoS One* 2010;5(12): e14472.
- [129] Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today* 1999;15(1): 22-8.
- [130] Halonen SK. Role of autophagy in the host defense against *Toxoplasma gondii* in astrocytes. *Autophagy* 2009;5(2): 268-9.
- [131] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases* 2008;46(2): 165-71.
- [132] Marchand RP, Culleton R, Maeno Y, Quang NT, Nakazawa S. Co-infections of *Plasmodium knowlesi*, *P. falciparum*, and *P. vivax* among Humans and *Anopheles dirus* Mosquitoes, Southern Vietnam. *Emerging infectious diseases* 2011;17(7): 1232-9.
- [133] William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S, et al. Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. *Emerging infectious diseases* 2011;17(7): 1248-55.
- [134] Frevert U, Engelmann S, Zougbede S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, et al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS biology* 2005;3(6): e192.
- [135] Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine* 2006;12(2): 220-4.
- [136] Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006;313(5791): 1287-90.

- [137] Jayabalasingham B, Bano N, Coppens I. Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance. *Cell Research* 2010; 20: 1043-1059.
- [138] Coppens I. Metamorphoses of malaria: the role of autophagy in parasite differentiation. *Essays in biochemistry* 2011;51: 127-36.
- [139] Vaid A, Ranjan R, Smythe WA, Hoppe HC, Sharma P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood* 2010;115(12): 2500-7.
- [140] Kitamura K, Kishi-Itakura C, Tsuboi T, Sato S, Kita K, Ohta N, Mizushima N. Autophagy-Related Atg8 Localizes to the Apicoplast of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Plos one* 2012;7(8): 1-10.