

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

***Toxoplasma gondii* - células epiteliais de felinos: novos
aspectos do ciclo enteroepitelial *in vitro***

por

Renata Morley de Muno

Rio de Janeiro
Outubro de 2015

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

***Toxoplasma gondii* - células epiteliais de felinos: novos
aspectos do ciclo enteroepitelial *in vitro***

por

Renata Morley de Muno

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área
de Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
Outubro de 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta tese intitulada:

***Toxoplasma gondii* - células epiteliais de felinos: novos aspectos
do ciclo enteroepitelial *in vitro***

Apresentada por:

Renata Morley de Muno

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Claudia Masini d'Avila Levy - Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz - Presidente

Dra. Laís de Carvalho - Instituto de Biologia /UERJ

Dra. Rossiane Claudia Vommaro – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz
(revisor e suplente)

Dra. Andrea Henriques Pons - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz (suplente)

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

M967 Muno, Renata Morley de

Toxoplasma gondii - células epiteliais de felinos: novos aspectos do ciclo enteroepitelial *in vitro* / Renata Morley de Muno. – Rio de Janeiro, 2015.

xiii, 139 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 120-139

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Células epiteliais. 3. Felinos. 4. Ciclo enteroepitelial. 5. Esquizontes *in vitro*. I. Título.

CDD 616.936

Esta tese foi desenvolvida sob orientação da Dra. Helene Santos Barbosa no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Rio de Janeiro teve o apoio financeiro das seguintes entidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES VI (Fiocruz)

Pronex 2010 - Programa de Apoio a Núcleos de Excelência- CNPq/FAPERJ

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

Data da matrícula no Programa de Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: Outubro de 2011.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

Dedico esta tese
à minha família que sempre me apoia
e ao meu amor, Ricardo,
Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois com certeza Ele abriu os caminhos para que eu chegasse à Fiocruz e conhecesse a Dra. Helene. É uma honra ter concluído o mestrado e agora o doutorado nessa instituição de pesquisa tão respeitada.

Helene, tenho muito orgulho de tê-la como minha orientadora e agradeço MUITO a Deus pela sua vida. Espero que ainda possamos trabalhar juntas por muitos anos! Tenho muito a lhe agradecer: por ser tão paciente, exigente, atenciosa, um exemplo de profissional e de orientador. Nunca deixa seus alunos “na mão”. Você tem todo meu respeito e admiração. Serei eternamente grata.

À minha família, minha mãe, meu exemplo de tudo, meu pai por todo carinho, meu irmão, por ser tão coruja, minha avó, tia e tios, primas...vocês são a minha base, minha fortaleza, amo muito todos vocês!!

Ao meu amor, meu marido, meu companheiro de todas as horas, Ricardo, muito obrigada por você ser tão presente, sempre me encorajando, me dando suporte emocional. Muito obrigada pela compreensão e paciência, e, principalmente pelo seu amor. Espero poder retribuir em dobro. Eu te amo!!

Aos meus amigos, principalmente amigas queridas que souberam entender a minha ausência durante este tempo e nunca deixaram de torcer por mim. Vocês são importantes demais na minha vida!

Ao Dr. Marcos Moura, famoso Marquinhos, obrigada pelas dicas, ideias, franqueza e constante estímulo, mesmo a distância.

Ao amigo e revisor, Rubem, obrigada por ser sempre acessível e disposto a ajudar!

Às amigas que fiz no LBE e no LUC, Cintia e Tati, obrigada pela torcida em todos os momentos, vocês estarão sempre comigo no meu coração, nossos almoços serão inesquecíveis e espero que nunca terminem!

A todos do LBE, mas em especial àqueles que sempre me acompanharam desde o mestrado, Sandra, e Erick, muito obrigada! Daniel, muito obrigada por toda disponibilidade, pelo apoio e por todas as dicas de PCR. Mariana, nosso contato foi pequeno mas suficiente pra notar seu apoio. Liandra, gostaria de ter acompanhado mais você, obrigada por ter cuidado tão bem das nossas filhas (rsrs), tenho muito orgulho de você. E à mais novata, mas não menos importante, Natássia, só posso lhe agradecer toda força num dos momentos que mais precisei.

Não poderia deixar de agradecer aos meus companheiros do Instituto de Pesquisas Biomédicas. Obrigada a todos vocês que sempre me apoiaram desde que cheguei no Instituto, em especial ao meu chefe, Dr. Leal, obrigada pela compreensão e incentivo.

Ao CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Ao IOC/ Fiocruz por toda estrutura profissional e acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz -Fiocruz

ÍNDICE

RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
I. INTRODUÇÃO	01
1. Considerações gerais	01
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	03
2.1. Formas infectivas	03
2.1.1. Taquizoítos	03
2.1.2. Bradizoítos e cistos teciduais	04
2.1.3. Esporozoítos	05
2.2. Ciclo biológico	07
2.2.1. Ciclo enteroepitelial ou sexuado	09
2.2.1.1. Esquizonte do Tipo A	12
2.2.1.2. Esquizonte do Tipo B	13
2.2.1.3. Esquizonte do Tipo C	13
2.2.1.4. Esquizonte do Tipo D	13
2.2.1.5. Esquizonte do Tipo E	14
2.2.1.6. Gametas e oocistos	14
3. Toxoplasmose: epidemiologia e patogenia	16
4. Linhagens clonais do <i>T. gondii</i>	18
5. Aspectos da interação <i>T. gondii</i> -célula hospedeira	19

6. Aspectos da diferenciação do <i>T. gondii</i> : estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	23
6.1. Cistogênese	23
6.2. Ciclo enteroepitelial	26
6.2.1. Linhagens celulares	26
7. Culturas primárias de células intestinais	28
II. OBJETIVOS	30
III. RESULTADOS	31
3.1. Artigo 1	31
3.2. Interação culturas primárias de células epiteliais intestinais de felinos - <i>T.gondii</i>	39
3.3. Capítulo de livro	57
3.4. Resultados complementares	71
IV. DISCUSSÃO	81
V. CONCLUSÕES	100
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

RESUMO

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório que infecta qualquer célula nucleada. Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos no ciclo de vida deste parasito, e suas células epiteliais intestinais são o nicho exclusivo para o desenvolvimento do ciclo sexuado do protozoário. A liberação de oocistos nas fezes de felinos contaminam o meio ambiente e este é o principal fator que explica a distribuição mundial da toxoplasmose. A infecção dos hospedeiros intermediários por oocistos, como aves e mamíferos de sangue quente, incluindo o homem, leva à formação de cistos teciduais, ampliando a transmissão do parasito, por meio do consumo de carne crua ou mal cozida. Os mecanismos que regem a diferenciação do *T. gondii* em células epiteliais e o conhecimento limitado do ciclo sexuado do parasito são as principais justificativas para o desenvolvimento desta tese. O emprego de células de felinos para o estudo da interação do *T. gondii* é pioneiro, criando novos campos de investigação sobre os aspectos da interação do parasito no hospedeiro definitivo. Assim, linhagens celulares oriundas do epitélio renal de felinos (CRFK) e de macaco verde (Vero), epitélio intestinal de ratos (IEC-6) e cultura primária de enterócitos de felinos (CEIF) foram utilizadas como modelo experimental da infecção pelo *T. gondii*. O desenvolvimento intracelular do parasito variou com a origem da célula epitelial e também com a relação parasito:célula hospedeira utilizada nos ensaios *in vitro*. As células de felino, CRFK, foram mais susceptível à infecção por bradizoítos do que as linhagens epiteliais de outras origens. A formação de cistos *in vitro* foi observada nas células CRFK e Vero ao se utilizar a relação de 1:10 (bradizoíto:célula hospedeira). Culturas de CEIF tiveram sua natureza epitelial revelada pela presença de citoqueratina, expressão de fosfatase alcalina intestinal, presença de microvilosidades e junções intercelulares. A infecção de CEIF com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 demonstrou que a carga parasitária foi decisiva para o destino intracelular do parasito: a relação de 1:5 favoreceu a proliferação de taquizoítos e o ciclo lítico; 1:10 foi determinante para o estabelecimento da cistogênese; e estruturas semelhantes a esquizontes foram identificadas quando a carga de 1:20 foi utilizada. A análise morfológica da infecção por períodos de 1 a 9 dias apontou diferentes estágios do parasito em células intestinais de felinos, semelhantes aos observados em estudos *in vivo*. Explorar esta nova linha de pesquisa, num campo ainda limitado aos ensaios de infecção experimental de gatos e preencher as lacunas no conhecimento da biologia do *T. gondii* em enterócitos de felinos é inovador e desafiador. Novas perspectivas se abrem, nos estudos dos aspectos moleculares que possam governar esta interação, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção de uma das principais rotas de disseminação da toxoplasmose.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, the etiologic agent of toxoplasmosis, is an obligate intracellular parasite that infects any nucleated cell. The felines are the only definitive hosts in the life cycle of this parasite, being the intestinal epithelial cells, the unique niche for the development of protozoan sexual cycle. The release of oocysts in the feces of cats contaminates the environment and is the main factor explaining the worldwide distribution of toxoplasmosis. The infection by oocysts of intermediate hosts, such as warm-blooded birds and mammals, including man, leads to the formation of tissue cysts, promoting the increase in the parasite transmission through the consumption of raw or undercooked meat. The mechanisms involved in *T. gondii* differentiation in epithelial cells and the knowledge of the parasite sexual cycle are still unclear, justifying the development of this thesis. The use of feline cells for study the *T. gondii* interaction is pioneer, evaluating novel fields of research on aspects of the parasite relationship in definitive host. Therefore, cell lines derived from feline epithelial kidney (CRFK) and Green Monkey epithelial kidney (Vero), rat intestinal epithelial (IEC-6) and primary cultures of feline intestinal epithelial cells (FIEC) were used as an experimental model for *T. gondii* infection. The intracellular parasite development was dependent on the epithelial cell source and on parasite: host cell used in *in vitro* assays. The feline cells, CRFK, were more susceptible to bradyzoites infection than epithelium from other sources. *In vitro* cyst formation was observed in CRFK and Vero cells by using the ratio 1:10 (bradyzoite: host cell). CEIF cultures had their epithelial nature revealed by presence of cytokeratin, intestinal alkaline phosphatase expression, presence of intercellular junctions and microvilli. The interaction FIEC-*T. gondii* bradyzoites ME49 strain demonstrated that the parasite load is crucial to definy the Apicomplexan intracellular destiny: a ratio of 1:5 favored the tachyzoites proliferation and the lytic cycle; 1:10 was crucial to the establishment of cystogenesis; and schizont-like structures were identified when the load 1:20 was used. Morphological analysis of the infection for periods of 1-9a days pointed to the different parasite stages in the cats gut, as previous observed in *in vivo* studies. To explore this novel research line, a still limited field for experimental infection to cats and to fill gaps in the knowledge of *T. gondii* biology in cat's enterocytes is exciting and poorly described. New perspectives are open to study molecular aspects involved in this interaction, contributing to the development of alternative intervention strategies of this crucial route of toxoplasmosis spread.

I. INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

Toxoplasma gondii foi descrito em 1908 simultaneamente por Nicolle e Manceaux na Tunísia e por Splendore no Brasil (Nicolle e Manceaux, 1908; Splendore, 1908). Parasito intracelular obrigatório pertence ao filo Apicomplexa, agente causador da toxoplasmose, com distribuição cosmopolita. Apresenta destacada importância médica e veterinária devido a sua alta capacidade de causar abortos ou doenças congênitas nos seus hospedeiros (Tenter, 2000).

O ciclo de vida completo do *T. gondii* somente foi descrito em 1970 (revisto por Dubey, 2008, 2009; Ferguson, 2009), quando o oocisto foi identificado nas fezes de gatos e caracterizado o desenvolvimento sexuado do parasito no intestino dos felinos. Assim, gatos domésticos e outras espécies de felinos foram introduzidos ao ciclo biológico do parasito como hospedeiros definitivos exclusivos do *T. gondii*, capazes de infectar ampla variedade de hospedeiros intermediários, como aves e a maioria dos mamíferos de sangue quente, inclusive o Homem (Elmore e cols., 2010; Jones e Dubey, 2010). Em humanos, a infecção de indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática, entretanto, em alguns casos, o parasito traz sérias consequências, principalmente para indivíduos imunossuprimidos e em crianças cujas mães tiveram contato com o parasito durante a gravidez (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Com relação à multiplicação do *T. gondii*, dois processos são observados: nos hospedeiros intermediários e definitivos, através dos estágios infectivos, taquizoítos e bradizoítos, a reprodução assexuada (Black e Boothroyd, 2000) e exclusivamente no epitélio intestinal dos felídeos, a reprodução sexuada, que envolve os processos de esquizogonia, gametogonia, e esporogonia resultando na formação de oocistos imaturos que são eliminados juntamente com suas fezes no ambiente (Frenkel e Dubey, 1972; Dubey e Frenkel, 1973; Dubey, 2002).

A alta disseminação do parasito na natureza se deve aos principais mecanismos de sua transmissão: (i) ingestão de bradizoítos contidos em cistos presentes em carne crua ou mal cozida; (ii) infecção com taquizoítos pela sua transmissão vertical da mãe para o feto, podendo resultar na toxoplasmose

congenita, (iii) pela ingestão de leite não pasteurizado contaminado com estas formas (Tenter, 2009); (iv) através de tecidos infectados em transplantes e transfusões de sangue (Hill e Dubey, 2002) ou pela recrudescência dos parasitos de pacientes cronicamente infectados, que pela terapia de imunossupressão desenvolvem a toxoplasmose encefálica, que na maioria dos casos é fatal; e ainda, (v) pela ingestão de esporozoítos contidos em oocistos liberados juntamente com as fezes de felídeos que contaminam alimentos, água e o solo (Dubey e cols., 2004).

Salvo raras exceções, as principais fontes de contaminação para o Homem são os animais. O número de felídeos infectados é um importante fator de transmissão, uma vez que permite a persistência de oocistos no ambiente. Um único felino é capaz de liberar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados para o meio ambiente. A prevalência de gatos não domésticos com soropositividade para toxoplasmose é geralmente alta aproximando-se de 100%. Enquanto a soroprevalência em gatos domésticos varia entre 30-40% (Elmore e cols., 2010). Os oocistos têm sido relatados como principais fontes de contaminação em mulheres grávidas no Brasil (Dubey e cols., 2012). Além disso, as infecções causadas por esta via parecem ser mais severas do que as induzidas por cistos teciduais (via ingestão de carne contendo cistos) (Remington e cols., 1995).

O conhecimento específico do ciclo entérico do *T. gondii* em felídeos está restrito a alguns poucos artigos que abordam a caracterização morfológica da diferenciação em modelos *in vivo* (Frenkel e Dubey, 1972; Dubey e Frenkel, 1972; Ferguson e cols., 1974; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009). A carência de modelos celulares que possibilitem explorar o ciclo entérico do parasito no hospedeiro definitivo foi a motivação para o desenvolvimento desta tese. A introdução de culturas primárias de células intestinais de felídeos, como modelo celular para o estudo da interação do *T. gondii*, abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias que possam interferir na disseminação dos oocistos na natureza, assim como, fornecer dados para o esclarecimento do seu ciclo entérico.

2. *Toxoplasma gondii*

A classificação do *T. gondii* no filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, foi baseada principalmente pela presença de um complexo apical onde se localizam as organelas secretórias especializadas, como róptrias e micronemas, bem como elementos do citoesqueleto, os anéis polares e conóide. (Dubey e cols., 1998).

2.1. Formas infectivas

O *T. gondii* apresenta três formas evolutivas responsáveis pela transmissão da toxoplasmose: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Figura 1).

2.1.1. Taquizoítos

O termo taquizoíto (taqui = rápido em grego) é devido à alta atividade multiplicativa deste estágio em praticamente qualquer célula nucleada. Os taquizoítos possuem forma alongada com tamanho de aproximadamente 6 por 2 μm , apresentando a região anterior pontiaguda e região posterior arredondada (Dubey e cols., 1998). Taquizoítos se replicam a cada 6-8h, no interior de um compartimento intracelular denominado vacúolo parasitóforo, em um processo de divisão conhecido por endodiogenia (revisto em Halonen e Weiss, 2013). Após várias replicações, os parasitos evadem da célula hospedeira e se disseminam, via hematogena, para vários tecidos (Dobrowolski e Sibley, 1996; Dubey e Frenkel, 1998). O estágio taquizoíto é responsável pela fase aguda da infecção, causando forte inflamação, destruição tecidual e as manifestações clínicas da doença (Schlütter e cols., 2014).

Ultraestruturalmente, os taquizoítos apresentam: película (revestimento externo), anéis preconoidal e apicais polares, o conóide, cinco a oito róptrias, micronemas, microporo, mitocôndria única e ramificada, arranjo de microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático, Golgi, acidocalcissomos, muitos grânulos densos e raros ou ausentes grânulos de amilopectina, apicoplasto e núcleo localizado na região central do corpo do parasito (de Souza e Souto-Padrón, 1978; Dubey e cols., 1998; Morrissette, 2015).

2.1.2. Bradizoítos e cistos teciduais

Bradizoíto (bradi = lento em grego) é a forma encontrada no interior de cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da doença. Reproduz-se lentamente por endodiogenia, pois a maioria desses estágios se encontra na fase G0 do ciclo celular com taxa de divisão mais baixa quando comparados com taquizoítos (Radke e cols., 2003).

Os bradizoítos medem aproximadamente de 7 por 1,5 μm (Mehlhorn e Frenkel, 1980). Ultraestruturalmente apresentam as mesmas organelas encontradas nos taquizoítos, entretanto, róprias em menor quantidade e mais eletrondensas, maior número de micronemas e também grande quantidade de grânulos de amilopectina, destacam-se dentre as principais diferenças. Nesta forma do parasito, o núcleo se localiza na região posterior (Jacobs e cols., 1960). Devido, a presença dos grânulos de amilopectina, os bradizoítos são reativos à marcação pelo ácido periódico de Schiff (PAS⁺) (Guimarães e cols., 2003). Presume-se que os bradizoítos alterem a composição da membrana do vacúolo parasitóforo, constituindo a parede cística, dando origem aos cistos teciduais, responsáveis pela fase crônica da doença (Dubey, 1998a; Tenter e cols., 2000).

Cistos teciduais variam de tamanho, os jovens podem medir cerca de 5 μm de diâmetro, com apenas dois bradizoítos no interior, até cistos mais maduros, que podem conter centenas de parasitos, alcançando cerca de 60 μm (Dubey e Carpenter, 1993; Dubey e cols., 1998). O tamanho do cisto depende de sua idade, do tipo da célula hospedeira e da cepa de *T. gondii* (Weiss e Kim, 2000). No cérebro, os cistos são muitas vezes de formato esferoidal e raramente alcançam um diâmetro de 70 μm , enquanto os cistos intramusculares são alongados e podem chegar até 100 μm de comprimento (Dubey e cols., 1998).

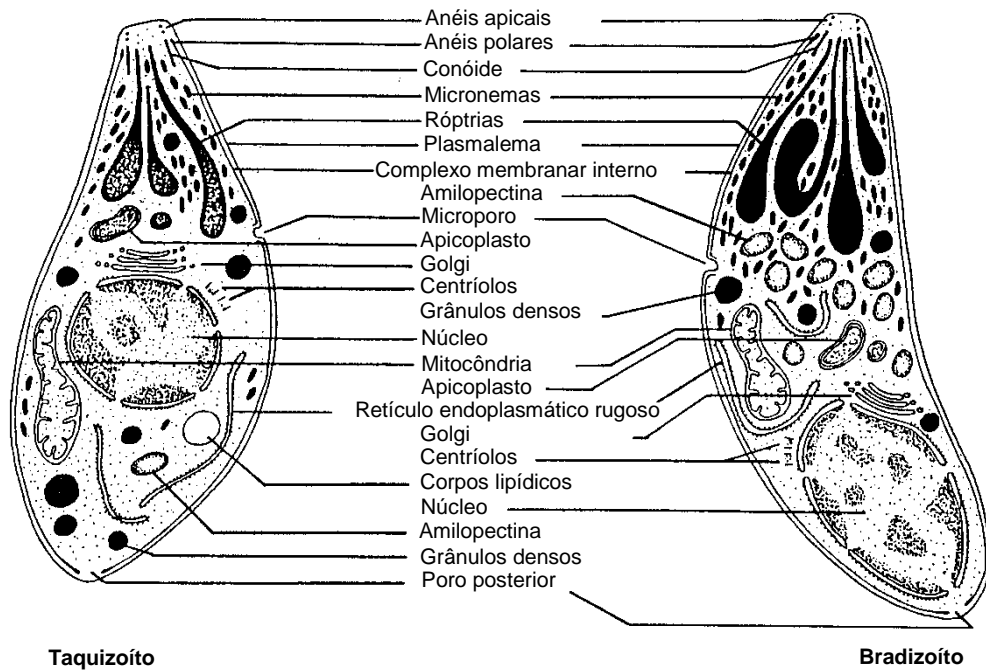
A parede cística tem sua origem de moléculas da célula hospedeira e do parasito (Ferguson e Hutchison, 1987) e é rica em açúcares e outros polissacarídeos (Speer e cols., 1998; Weiss e Kim, 2000; Guimarães e cols., 2003). Embora possam ser encontrados em diversos tecidos, os cistos são mais prevalentes no sistema neuronal e muscular, ou seja, cérebro, olhos, músculo esquelético e cardíaco (Dubey e cols., 1998; Tenter e cols., 2000).

Cistos intactos provavelmente não causam lesão tecidual e podem persistir durante toda a vida do hospedeiro, sem causar resposta inflamatória (Dubey e Welcome, 1988; Dubey e cols., 1998; Hill e Dubey, 2002). Acredita-se que a parede do cisto possa conferir resistência evitando ruptura do cisto, protegendo os bradizoítos de condições ambientais hostis, incluindo a resposta imunológica do hospedeiro. Recentemente, a proteína de parede cística CST1 foi identificada e com papel crucial na integridade da parede, resistência contra o estresse mecânico e também para a persistência dos bradizoítos (Tomita e cols., 2013).

2.1.3. Esporozoítos

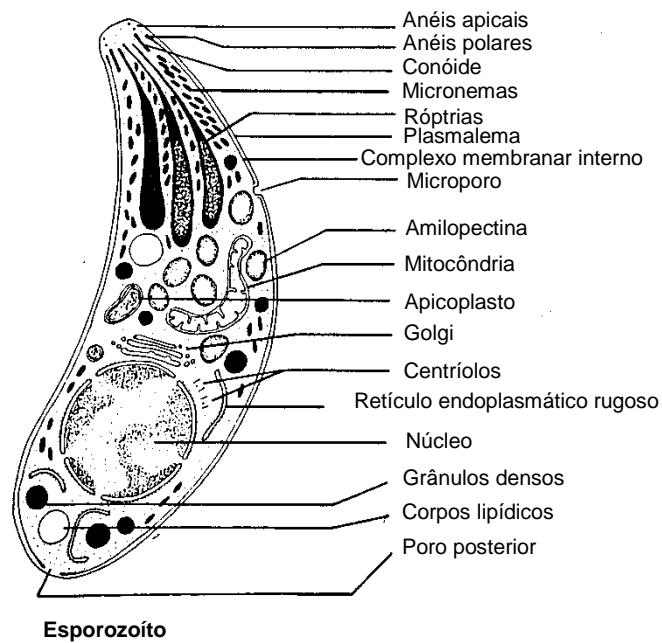
Esporozoítos são as formas infectivas do *T. gondii* encontradas no interior dos oocistos. Cada oocisto possui dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Após o processo de replicação sexuada, os oocistos são produzidos no epitélio intestinal superficial dos felídeos e eliminados ainda imaturos para o meio ambiente juntamente com suas fezes. Em condições adequadas de umidade e temperatura, os oocistos sofrem maturação, tornando-se infectivos para diversos hospedeiros (Dubey e Frenkel, 1972; 1973; Tenter e cols., 2000; Hill e Dubey, 2002; Dubey, 2008; 2009; Ferguson, 2009; Elmore e cols., 2010).

Ultraestruturalmente, os esporozoítos representam a forma intermediária entre taquizoítos e bradizoítos, considerando-se a quantidade de algumas organelas (Speer e cols., 1998). Esses estágios apresentam número intermediário de micronemas, numerosos grânulos densos semelhantes aos taquizoítos e quantidade de grânulos de amilopectina semelhante aos bradizoítos (Speer e cols., 1998). Corpúsculos lipídicos são numerosos nos esporozoítos, raro em taquizoítos e ausentes em bradizoítos (Dubey e cols., 1998).



Taquizoíto

Bradizoíto



Esporozoíto

Figura 1. Ultraestrutura das formas infectivas de *T. gondii*. Reproduzido e adaptado de Dubey e cols. (1998).

2.2. Ciclo biológico

Um dos pontos chave para a melhor compreensão da biologia do *T. gondii* e da relevância clínica da toxoplasmose é a alta complexidade do ciclo de vida do parasito, tendo os felídeos como hospedeiros definitivos exclusivos e uma grande variedade de hospedeiros intermediários, incluindo os próprios felídeos e o Homem (Dubey e Welcome, 1988; Dubey e cols., 2004; Schlüter e cols., 2014).

Os hospedeiros se contaminam com este parasito principalmente através da ingestão de cistos teciduais contidos em carnes cruas ou mal cozidas, de oocistos presentes em alimentos ou água ou ainda, pela transmissão congênita (Hill e Dubey, 2002). As vias de infecção também podem ocorrer por meio de tecidos transplantados, transfusões de sangue, e ingestão de leite não pasteurizado (Tenter e cols., 2000) (Figura 2).

A infecção via consumo de carne contaminada crua ou mal cozida (Dubey e cols., 2005; Hill e cols., 2010), se estabelece quando após a ingestão do cisto sua parede é digerida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino e os bradizoítos, resistentes a essas enzimas, são liberados. Ao alcançarem a lâmina própria do intestino, se diferenciam em taquizoítos, se multiplicam e em poucas horas se disseminam para outros tecidos, por meio do sangue ou da linfa.

Os felinos adquirem a toxoplasmose principalmente pelo carnivorismo, por se alimentarem de presas infectadas (aves e roedores). Quando infectados estabelece-se o ciclo enteroepitelial, que corresponde a replicação sexuada, culminando com a produção de oocistos (Dubey e cols., 1970). Em condições adequadas de umidade e temperatura, oocistos esporulam e se tornam infectivos dentro de 1-5 dias, podendo sobreviver por anos no meio ambiente. Dependendo da cepa de *T. gondii*, a ingestão de apenas 10 oocistos esporulados pode causar infecção em hospedeiros intermediários e também como fonte de infecção dos hospedeiros definitivos (revisado em Tenter e col., 2000). Após a ingestão de oocistos por novos hospedeiros, através da água, alimentos e solo contaminados, da mesma forma que os cistos, os oocistos sofrem ação das enzimas proteolíticas no estômago liberando os esporozoítos, que

a depender do hospedeiro, irá estabelecer o ciclo sexuado ou assexuado do parasito.

A transmissão congênita ocorre durante a fase aguda da doença em mulheres grávidas soronegativas, quando os taquizoítos encontram-se no sangue, e atravessam a placenta e infectam o embrião ou feto (Montoya e Remington, 2008). A fase da gestação em que a toxoplasmose é adquirida pela gestante é um importante fator nos índices de transmissão do parasito e na severidade da infecção congênita. O risco de infecção fetal aumenta com a idade gestacional, mas a severidade dos sintomas clínicos diminui ao longo do tempo. Durante o primeiro trimestre, a transmissão é relativamente baixa (<20%) mas, se aproxima de 80% no último trimestre (Jones e cols., 2003; Ortiz-Alegria e cols., 2010; revisto em Schlüter e cols., 2014).

Desta forma, podemos observar que o ciclo do *T. gondii*, além de complexo, é também dinâmico considerando-se que o parasito pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário e vice-versa, bem como entre os hospedeiros definitivos e entre os hospedeiros intermediários (Tenter e cols., 2000).

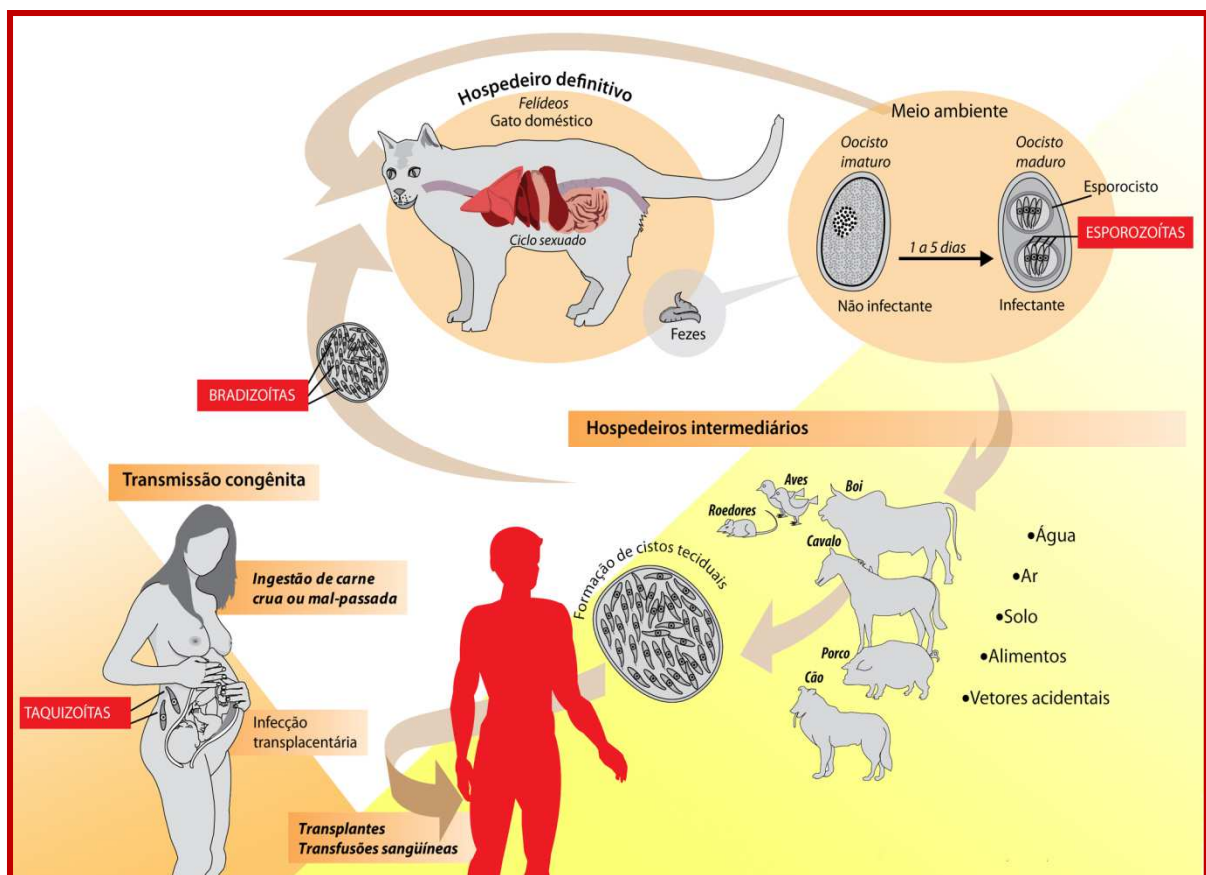


Figura 2. Ciclo de vida do *T. gondii*: Ciclo biológico ilustrado mostrando as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos (Moura e cols., 2009).

2.2.1. Ciclo enteroepitelial ou sexuado

Os gatos domésticos podem excretar milhões de oocistos após ingerir qualquer um dos três estágios infectantes do *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. O tempo de pré-patência (correspondente ao período da ingestão até a liberação dos oocistos no ambiente) e a frequência da liberação destes oocistos, dependem da forma infectante ingerida (revisado em Dubey, 1998a; Dubey, 2002; 2006). Desta forma, a liberação de oocistos pelos gatos pode ocorrer de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais (Dubey, 2006), de 11-17 dias após a ingestão de taquizoítos (Dubey, 2002) e 18 ou mais dias após ingestão de oocistos (Dubey, 2001, 2005; Dubey e Frenkel, 1972, 1976).

Paralelamente, o ciclo assexuado ocorre também nos felinos gerando lesões semelhantes àsquelas observadas no quadro clínico dos hospedeiros intermediários (Dubey e Frenkel, 1972). Após a ingestão dos cistos teciduais ou oocistos pelos gatos, a parede do cisto e do oocisto é destruída por enzimas proteolíticas do estômago e intestino delgado, liberando os bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, que penetram na parede intestinal. De acordo com Ferguson (2004), os esporozoítos intracelulares se diferenciam em taquizoítos, enquanto os estágios bradizoítos serão os únicos competentes para iniciar o ciclo enteroepitelial, gerando então os merozoítos, dando início ao ciclo sexuado do *T. gondii* no hospedeiro definitivo (Figura 3). Os taquizoítos e merozoítos proliferam-se rapidamente dentro de um hospedeiro. A diferença entre estes estágios é que taquizoítos proliferam indiscriminadamente em todas as células nucleadas e se disseminam para todos os tecidos do hospedeiro, enquanto os merozoítos tem a proliferação limitada a algumas gerações (2-4) dentro dos enterócitos do intestino felino. O papel de bradizoítos e esporozoítos é transmitir a infecção entre hospedeiros e para tal, estas formas do parasito têm que sobreviver aos rigores do ambiente externo e/ou do trato digestivo do novo hospedeiro. Nos enterócitos que contem bradizoítos, se inicia o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii* (Dubey e Frenkel, 1972), que se caracterizam por cinco tipos de *T. gondii* morfológicamente distintos, esquizontes ou estágios enteroepiteliais (tipos: A, B, C, D e E). Os esquizontes se multiplicam exclusivamente nas células superficiais intestinais (enterócitos) dos felinos e após a replicação por endopoligenia dão origem aos merozoítos (Dubey e Frenkel, 1972; Frenkel e Dubey, 1972). Os

merozoítos maduros liberados são capazes de invadir novos enterócitos e se diferenciar em estágios sexuais, tanto microgametócito quanto macrogametócito (Ferguson, 2009) (Figura 4).

Os fatores envolvidos no destino dos merozoítos são desconhecidos, entretanto sabe-se que os ciclos assexuais iniciais são necessários para aumentar a densidade de parasitos no intestino seja devido ao desenvolvimento sexual bem sucedido, onde os gametas, masculino e feminino, devem se encontrar; ou ainda devido a cada macrogameta produzir apenas 1 oocisto, existindo a demanda de milhares de merozoítos capazes de se diferenciar em macrogametas para produzir uma grande quantidade de oocistos (milhões) como tem sido observado nas fezes de felinos (Ferguson, 2009).

A gametogênese do *T. gondii* ocorre nas células superficiais do intestino delgado, mais comumente na região jejuno-ileal. Tem sido proposto que os gametas masculinos biflagelados ou microgametas evadem das células da parede intestinal, alcançam a luz intestinal e são atraídos pelos gametas femininos ou macrogametas no interior dos enterócitos (revisado por Speer e Dubey, 2005; Ferguson, 2009). Ao invadirem as células contendo os macrogametas ocorre a fecundação, dando origem ao ovo ou zigoto com a formação da parede do oocisto. As células epiteliais infectadas se rompem e os oocistos imaturos alcançam o lúmen intestinal (Dubey e Frenkel, 1972), que são liberados junto com as fezes do felino no ambiente.

Existem hipóteses de que o ciclo sexual deste parasito deva ser orquestrado e modulado por moléculas presentes nos enterócitos de felídeos que induzem as fases citadas acima, já que estas formas ocorrem exclusivamente nesse hospedeiro (Moura e cols., 2009).

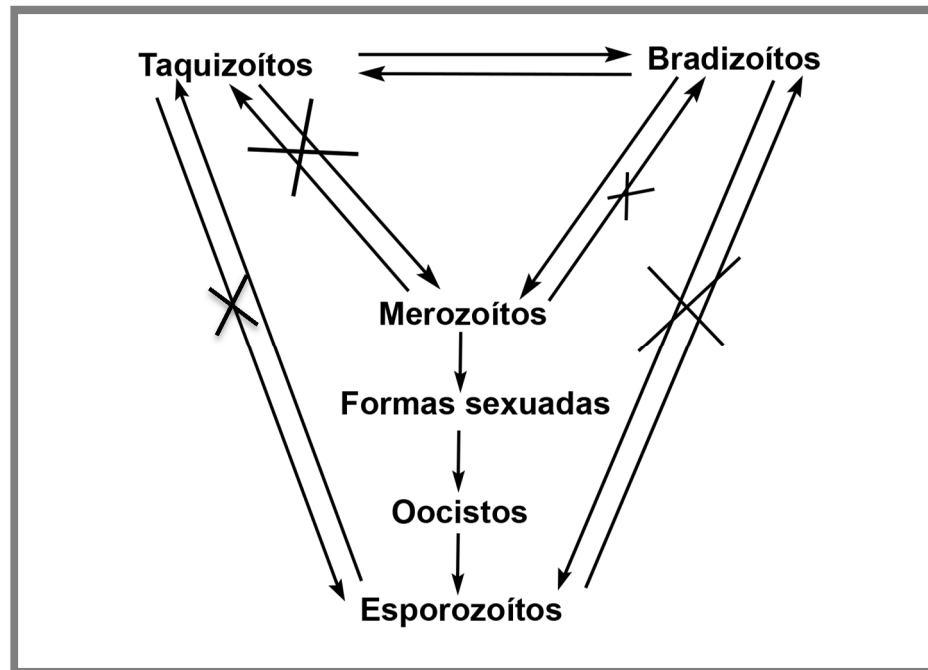


Figura 3. Linhas de diferenciação do *T. gondii*. O diagrama mostra as linhas de desenvolvimentos e estágio-conversões que ocorrem entre as diferentes formas infectivas durante o ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. As setas inteiras representam as conversões já estabelecidas, enquanto as cruzes representam as conversões que provavelmente não ocorrem (Ferguson, 2004).

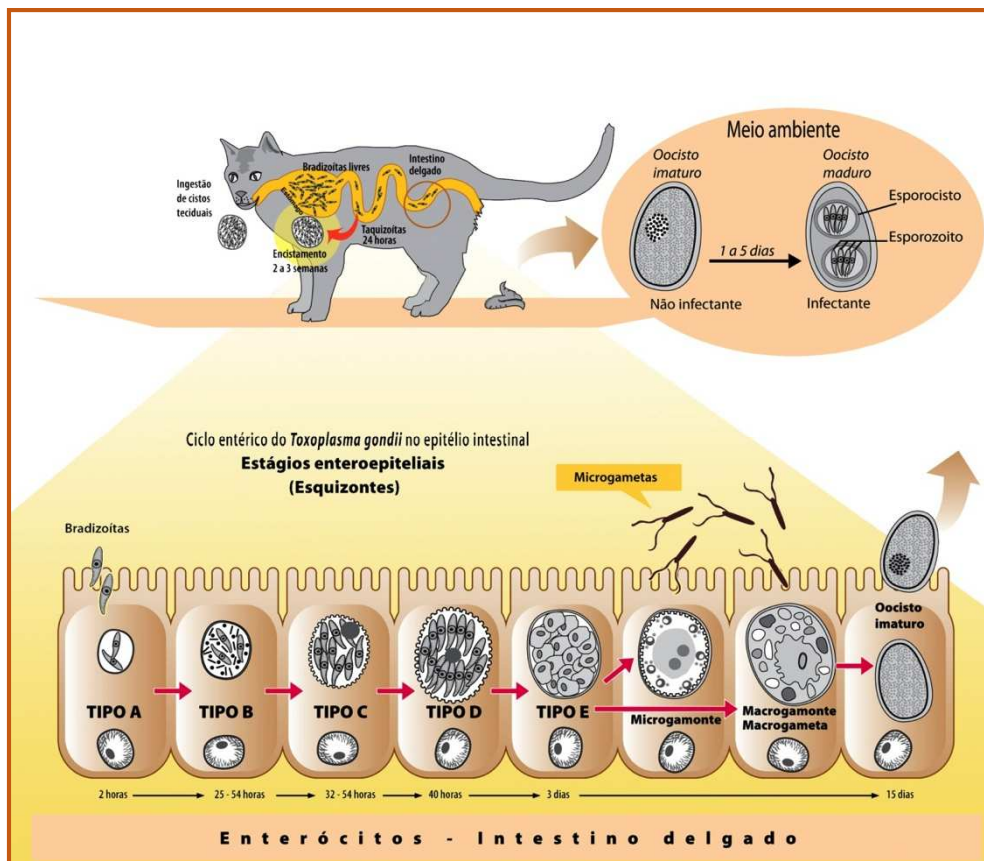


Figura 4. Ciclo enteroepitelial do *T. gondii*: Estágios enteroepiteliais do ciclo do *Toxoplasma gondii* nas células epiteliais superficiais do intestino delgado do gato doméstico. Criação e adaptação por M. Moura e H. S. Barbosa (2009) com base principalmente nos artigos de Ferguson (2004) e Speer e Dubey (2005).

2.2.1.1. Esquizonte do Tipo A

É o primeiro estágio de desenvolvimento observado no intestino dos gatos, a partir de 12 h de infecção. Possuem núcleo centralizado, podem ser corados pelo Giemsa e não são reativos ao ácido periódico de Schiff (PAS). Esse estágio é observado em enterócitos superficiais e às vezes na lâmina própria intestinal (Dubey e Frenkel, 1972).

2.2.1.2. Esquizonte do Tipo B

Ocorre de 12 a 54 h pós-infecção. A divisão destes organismos ocorre por endodiogenia (Dubey e Frenkel, 1972). Localizam-se em um grande vacúolo parasitóforo (VP) de membrana delgada, constituído por uma rica rede de membranas tubulovesicular (RMT) (Dubey e Frenkel, 1972). Ultraestruturalmente são muito similares aos taquizoítos, porém ocorrem exclusivamente em enterócitos felinos, medindo 5,8x2,9 μm . Possuem poucos e pequenos grânulos de amilopectina e róptrias pouco definidas (Dubey e Frenkel, 1972). Muitos esquizontes do tipo B permanecem no mesmo VP após várias divisões e formam estruturas grandes multinucleadas. Estas formas multinucleadas apresentam numerosos corpos lipídicos e mitocôndria com matriz eletrondensa moderada (Dubey e Frenkel, 1972; Speer e cols., 1998; Speer e Dubey, 2005).

2.2.1.3. Esquizonte do Tipo C

Os esquizontes do tipo C se desenvolvem a partir de 24 h no interior do VP em forma de roseta. Individualmente são alongados com o núcleo subterminal (Dubey e Frenkel, 1972) e medem cerca de 6,0x1,5 μm , multiplicando-se no interior de enterócitos ou linfócitos intraepiteliais por endopoligenia. Ultraestruturalmente, os esquizontes do tipo C contêm poucos micronemas, poucos grânulos densos, muitos corpos lipídicos e pequenas mitocôndrias (Speer e Dubey, 2005). A forma intermediária do esquizonte do tipo C apresenta vários núcleos com nucléolos evidentes. O VP não contém RMT e a membrana do VP é intimamente associada à membrana do esquizonte. Eventualmente, os merozoítos brotam na superfície do esquizonte formando um corpo residual medindo aproximadamente 2x3 μm , contendo resíduos de mitocôndria, ribossomos, retículo endoplasmático e grânulos de amilopectina (Speer e cols., 1998; Speer e Dubey, 2005).

2.2.1.4. Esquizonte do Tipo D

A partir de 32 horas a 15 dias pós-ingestão de cistos teciduais, os esquizontes do tipo D são observados em grande quantidade nas células epiteliais da base das vilosidades intestinais e medem cerca de 5,8x1,3 μm . Ultraestruturalmente, os esquizontes do tipo D apresentam róptrias eletrondensas e vacúolos preenchidos com material granular localizados acima do complexo de Golgi (Speer e Dubey, 2005).

2.2.1.5. Esquizonte do Tipo E

A partir de 3 a 15 dias pós-infecção são observados esquizontes do tipo E, que medem cerca de 4,5x1,1 μm e surgem a partir de esquizontes do tipo D que migraram para células vizinhas e se replicaram por endopoligenia. Embora compartilhem características morfológicas com estágios anteriores, esquizontes do tipo E e merozoítos apresentam características distintas: nas fases inicial e intermediária exibem forma angular com numerosas mitocôndrias proeminentes. Durante a fase tardia de endopoligenia, merozoítos emergem de um corpo residual localizado no centro do esquizonte. Possuem rótrias eletrondensas, mitocôndrias grandes e diversos corpos granulares (Speer e Dubey, 2005).

As fases evolutivas, tipos A, B, C, D e E, parecem ser exclusivas do ciclo do *T. gondii*, uma vez que em estudos com outros coccídeos, estes tipos nunca foram observados (Dubey e Frenkel, 1972). Os tipos A, B e C acontecem de forma sequencial, ou seja, o tipo A conduz à formação dos tipos B e C, estes amadurecem rapidamente e desaparecem conforme vão surgindo as formas do tipo D. Os gametócitos só são observados na ausência dos tipos A, B e C. Os tipos D e E ocorrem simultaneamente com os gametas, sugerindo que estas fases sejam precursoras dos gametas ou variantes do mesmo estágio biológico evolutivo (Dubey e Frenkel, 1972).

2.2.1.6. Gametas e oocistos

Gametas e oocistos estão presentes de 4 a 6 dias após a infecção e se desenvolvem exclusivamente nos enterócitos. Os merozoítos maduros formados por endopoligenia são liberados, podem invadir novos enterócitos e entrar em repetidos ciclos de replicação assexuada ou se diferenciarem em estágios sexuais, tanto microgameta como macrogameta. Os microgametas (5,7x3,5 μm) possuem o núcleo pequeno, citoplasma mais claro, comparando-se com os esquizontes tipos D e E, além de dois flagelos (Dubey e Frenkel, 1972). Apresentam uma única mitocôndria, núcleo eletrondenso e complexo membranar interno com aproximadamente 12 microtúbulos. O VP que envolve o microgameta é preenchido por material eletrólucido (Speer e Dubey, 2005).

Os termos microgameta e microgametócito são sinônimos. O desenvolvimento se inicia com uma fase proliferativa de divisões nucleares repetidas, seguida do

deslocamento dos núcleos para a periferia com marcada condensação de cromatina periférica. O microgameta é formado por brotamentos de uma região do citoplasma contendo dois corpos basais, dos quais crescem dois longos flagelos, com uma região eletrondensa onde se visualizam o núcleo e a mitocôndria (Ferguson e cols., 1974; Dubey e cols., 1998; revisto por Ferguson, 2009). Os microgametas maduros são destacados do citoplasma residual e surgem como estruturas alongadas com núcleo eletrondenso anterior à mitocôndria e aos corpos basais dos dois flagelos. Devido à semelhança com o espermatozóide o uso do termo gameta masculino foi adotado. Ferguson e cols. (2008) mostraram o primeiro marcador de microgametas, a proteína MORN1, localizada na região anterior deste estágio.

Assim como em microgametas, os termos macrogameta e macrogametócitos também são sinônimos onde a maturação da origem a um único macrogameta. Os macrogametócitos têm duas funções muito importantes de sintetizar e estocar todos os nutrientes necessários para a esporulação do oocisto no meio ambiente e sustentar a viabilidade dos esporozoítos por longos períodos, além de sintetizar componentes específicos necessários para formação da parede do oocisto. Por este motivo, durante o desenvolvimento, não ocorre divisão nuclear, mas a medida que o parasito cresce, grande quantidade de grânulos de amilopectina e corpúsculos lipídicos são sintetizados e armazenados no citoplasma. Estruturas específicas que estarão envolvidas na formação da parede do oocisto podem ser identificadas nos macrogametas: grande quantidade de grânulos densos, bem como precipitados eletrondensos no interior do retículo endoplasmático denominados corpos formadores de parede do tipo 2 (WFB2) (Ferguson e cols., 1975; Dubey e cols., 1998).

Speer e Dubey (2005) observaram a formação de uma parede eletrondensa constituída por quatro membranas e o desaparecimento da MVP durante o desenvolvimento do oocisto. Os oocistos não esporulados têm a forma sub-esférica e quando esporulados, maduros, possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos em cada (revisto em Dubey e cols., 1998). A parede do oocisto é composta por uma bicamada, sendo a camada externa mais fina do que a camada interna (Speer e cols., 1998). Estas camadas não são intimamente ligadas entre si, uma vez que a camada externa pode ser facilmente retirada com o uso de hipoclorito de sódio (Mai e cols., 2009; Fritz e cols., 2012; Dumètre e cols., 2013). A parede do oocitos é composta em mais de 90% de proteínas (Fritz e cols., 2012). Como essas proteínas são processadas na formação da parede ainda não está

esclarecido (Dumètre e cols., 2012). Estudos recentes sugerem forte contribuição de ligação cruzada de proteínas ricas em tirosina na formação e enriquecimento da parede do oocisto em *T. gondii* e outros coccídeos (Belli e cols., 2006; Dumètre e cols., 2012) resultando no desenvolvimento de sua típica autofluorescência azul (AF) sob excitação UV (Fritz e cols., 2012). Esta organização complexa também sugere robustez da parede do oocisto que é importante em termos de mecânica (Belli e cols., 2006; Dumètre e cols., 2012). Assim, a medição de propriedades mecânicas da parede do oocisto parece ser relevante durante a investigação da estrutura e composição química de cada camada da parede do oocisto na resistência global do oocisto a vários agentes físicos e químicos (Dumètre e cols., 2012). Dumètre e cols. (2013) abordaram aspectos estruturais e químicos da parede pela combinação de tratamentos da sua superfície, imagens de fluorescência, microscopia eletrônica e medições de suas características mecânicas por meio de microscopia de força atômica. Estes estudos sugerem um papel chave da biologia mecânica da parede do oocisto na manutenção da sua integridade no ambiente ou na resistência a desinfetantes, e, assim, na sua alta infectividade para os seres humanos e animais.

3. Toxoplasmose: epidemiologia e patogenia

A toxoplasmose é uma zoonose com alta prevalência no mundo e acomete aproximadamente 25-30% da população mundial (Black e Boothroyd, 2000; Tenter e cols., 2000). A soroprevalência varia de 10-80% entre os países e até mesmo entre as regiões de um mesmo país (Schlüter e cols., 2014). Os índices mais altos são observados na América Latina e em países da África tropical (Robert-Gangneux e Darde, 2012). No Brasil, a taxa de infecção varia de 50-80% da população dependendo do local de estudo (Dubey, e cols., 2012). Esta variação pode ser explicada por diversos fatores, como a presença e quantidade de felinos no local, clima, cultura e hábitos regionais (Halonen e Weiss, 2013).

Muitas das infecções em humanos são em decorrência do consumo de carne crua ou mal cozida (Tenter e cols., 2000; Dubey e cols., 2005). Entretanto, a prevalência em populações que não consomem carne ou que a consomem bem cozida, sugere que a transmissão via oocistos através do solo, água e/ou vegetais crus ou não higienizados, é também de grande relevância (Roghmann e cols., 1999; Chacin-Bonilla e cols., 2001). Não menos importante, a transmissão via taquizoítos pode ocorrer em alguns casos, como pela ingestão de leite contaminado não

pasteurizado e pela transmissão congênita da mãe para o feto durante a gestação. Casos de taquizoítos em órgãos transplantados e de infecção durante a transfusão de sangue também são relatados (Tenter e cols., 2000; Hill e Dubey, 2002; Tenter, 2009).

Quando ocorre a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos ou de oocistos contendo esporozoítos, estes se diferenciam em taquizoítos, estágio em que o parasito se multiplica rapidamente, se disseminando para diversas células e tecidos do hospedeiro, causando danos teciduais e ativando respostas inflamatórias. O principal mecanismo de resistência ao *T. gondii* se deve ao tipo de resposta primária, mediada por células Th-1 que depende da produção de interleucina-12 (IL-12) e interferon- γ (IFN- γ) (Gazzinelli e cols., 1994; Sher e cols., 2003). A síntese de IL-12 é estimulada por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, que são infectados pelo parasito na fase inicial. Desta forma, a IL-12 induz a síntese de IFN- γ por células NK e linfócitos T. IFN- γ leva à ativação de vários mecanismos microbicidas (intermediários reativos de oxigênio, privação de triptofano, óxido nítrico, dentre outros) que limitam a proliferação de taquizoítos (Yarovinsky, 2014). Frente a esses mecanismos de resposta, taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, iniciando um processo de replicação lenta, acompanhada de uma reorganização na membrana do vacúolo parasitóforo, induzindo à formação da parede cística.

Os cistos podem ser detectados entre seis a sete dias após a infecção (Dubey e cols., 1998) e podem conter centenas de bradizoítos no seu interior. Essas formas podem persistir por longos períodos em diversos tecidos de seus hospedeiros. Entretanto, não são totalmente estáveis e parecem liberar esporadicamente bradizoítos que podem se converter a taquizoítos, invadir novas células adjacentes e interconverter a bradizoíto, formando novos cistos teciduais mesmo em hospedeiros imunocompetentes. Os cistos são encontrados principalmente nos tecidos muscular e nervoso, mas também há relatos de identificação de cistos em órgãos viscerais, como pulmões, fígado e rins (revisado por Skariah e cols., 2010). Essas formas caracterizam a fase crônica da doença. Acredita-se que a parede cística forneça estabilidade e proteção aos parasitos contra a ação efetora do sistema imune do hospedeiro, facilitando a persistência dos cistos por longos períodos no organismo (Weiss e Kim, 2000). Com a queda da resposta imune, como ocorre em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), ou em pacientes que receberam drogas imunossupressoras, ocorre a reativação da infecção. Esta reativação leva à liberação de bradizoítos e taquizoítos com rápida disseminação,

resultando em destruição celular, provocando lesões em diversos órgãos, podendo ocasionar pneumonias e encefalite aguda (Halonen e Weiss, 2013).

A infecção primária adquirida durante a gravidez pode resultar em toxoplasmose congênita e aborto. Como consequência da transmissão do parasito durante a gravidez, as lesões ocasionadas pela infecção do feto, incluem a coriorretinite e retardo mental, que podem se tornar aparentes meses ou anos após o nascimento. A incidência de toxoplasmose congênita foi avaliada em diferentes países e acredita-se que o índice seja de 3,3 a cada 10.000 nascimentos na França e 1 a cada 3.000 nascimentos no Brasil (Neto e cols., 2000; Villena e cols., 2010; revisto em Schlüter e cols., 2014).

Atualmente existem drogas que atuam efetivamente sobre as formas taquizoítas, como a associação de sulfadiazina com pirimetamina (Montoya e Liesenfeld, 2004). Esses medicamentos, no entanto, surtem pouco ou nenhum efeito em bradizoítos no interior de cistos encontrados na fase crônica, além de ocasionarem efeitos colaterais (de Souza, 2014). Estes fatores conduzem à necessidade da introdução de novos medicamentos a partir da geração de conhecimento sobre a toxoplasmose, como por exemplo, com relação aos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação, nos diferentes tipos celulares onde ocorre o ciclo de vida do *T. gondii*.

4. Linhagens clonais do *T. gondii*

A maioria dos isolados identificados na Europa e na América do Norte pertence a um dos três genótipos: tipos I, II ou III. As linhagens apresentam cerca de 1% de variabilidade genética, sendo variações dentro de cada genótipo consideradas raras (Boothroyd e Grigg, 2002; revisto em Montoya e Liesenfeld, 2004).

Diferenças significativas quanto à virulência em camundongos foram encontradas entre essas três linhagens clonais. Linhagens do tipo I, como a RH, são altamente virulentas. As linhagens do tipo II, como a ME49, são menos virulentas e do tipo III são moderadamente virulentas (Howe e Sibley, 1995; revisto em Weiss e Kim, 2000; Ajzenberg e cols., 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004). Pressupõe-se que o tipo clonal possa determinar a virulência do parasito em humanos (Boothroyd e Grigg, 2002; Saeij e cols., 2005).

Estudos na Europa e Estados Unidos indicam que cepas pertencentes ao tipo II são encontradas com mais frequência em animais e humanos (Howe e cols., 1997;

Fuentes e cols., 2001). Em contrapartida, Ajzenberg e cols. (2009) analisaram 88 isolados de *T. gondii* de pacientes imunocomprometidos e não encontraram diferenças específicas significativas. Os mesmos autores não encontraram cepas tipo I em amostras de mais de 500 pacientes que apresentavam sinais clínicos diferenciados da toxoplasmose (Ajzenberg, 2010), ainda não havendo evidências de que sintomas específicos da doença estejam associados com determinados genótipos do *T. gondii* (Schlüter e cols., 2014).

Algumas cepas pertencem a outros grupos distintos e foram denominadas cepas atípicas, sendo mais frequentes em outras regiões do mundo, como a América Latina (Ajzenberg, 2010). Cepas atípicas são geradas a partir de cruzamento de duas cepas distintas durante o ciclo sexuado do parasito no intestino de felídeos infectados, dando origem a esporozoítos com um perfil genético diferenciado.

Particularmente no Brasil, a população de *T. gondii* tem sido descrita como extremamente diversificada. Acredita-se que mulheres gestantes com imunidade desenvolvida contra genótipos clássicos, podem não responder com eficácia às novas infecções adquiridas causadas por essas cepas atípicas (Lindsay e Dubey, 2011). A interpretação dos sintomas clínicos durante a toxoplasmose como indicador de efeitos dependentes do tipo do parasito é ainda mais complicada, devido a variedade de vias de transmissão. A contaminação da água potável com oocistos pode causar surtos locais de toxoplasmose (Jones e Dubey, 2010; Baldursson e Karanis, 2011), como já descritos no Canadá (Bowie e cols., 1997), Índia (Palanisamy e cols., 2006; Balasundaram e cols., 2010) e Brasil (Bahia-Oliveira e cols., 2003; de Moura e cols., 2006; Vaudaux e cols., 2010).

5. Aspectos da interação *T. gondii* – célula hospedeira

Os membros do filo Apicomplexa são parasitos intracelulares obrigatórios que têm a necessidade de invadir as células hospedeiras para se multiplicar e ainda, migrar através dos tecidos. A invasão é um processo rápido (menos de 1 min) (Morisaki e cols., 1995; Drewry e Sibley, 2015), envolvendo as etapas de reconhecimento, adesão e penetração ativa na célula hospedeira (Carruthers e Boothroyd, 2007). Como não possuem pseudópodes, cílios ou flagelos, os Apicomplexa utilizam um tipo de motilidade, conhecido como “gliding”, ou seja, motilidade por deslizamento (Drewry e Sibley, 2015). De acordo com os modelos atuais existentes, a força gerada pela motilidade por deslizamento pode ser

explorada para a movimentação ao longo do substrato, para invasão de uma célula hospedeira ou de barreiras biológicas, ou ainda para o egresso da célula hospedeira (Sibley, 2011). A motilidade por deslizamento é impulsionada por um complexo motor formado por actina e miosina, conhecido por glideossomo (revisto em Boucher e Bosch, 2015).

A primeira etapa da invasão é o reconhecimento e adesão à célula hospedeira, etapa esta mediada pela secreção sequencial de proteínas dos micronemas, predominantemente, adesinas (Carruthers e Sibley, 1997; Lebrun e cols., 2005; Alexander e cols., 2005; Wang e cols., 2014). As adesinas irão formar complexos específicos de interação parasito-célula hospedeira sendo utilizadas para invadir diversos tipos celulares. Uma vez secretadas, as MICs são localizadas na superfície de membrana do parasito para interagir com os receptores de superfície das células hospedeiras (Carruthers e Tomley, 2008) através de domínios adesivos como trombospondina tipo 1, EGF e integrinas (Anantharaman e cols., 2007). A conexão entre as MICs e o complexo actina-miosina do protozoário em conjunto com receptores ligantes de MICs da célula hospedeira permitem a entrada do parasito (Sibley, 2011). A secreção de proteínas pelos micronemas também é regulada pelos níveis citoplasmáticos de cálcio, íons envolvidos na regulação de diversos processos fisiológicos como, motilidade, extrusão do conóide e egresso do parasito (Caldas e cols., 2010).

Logo após a liberação das MICs, as róprias secretam suas proteínas, denominadas “rhoptry neck proteins” (RONs). Este processo é crítico para a formação de uma estrutura conhecida com junção móvel (JM) (Boothroyd e Dubremetz, 2008; Besteiro e cols., 2011). A JM permite o ancoramento do parasito à célula hospedeira durante a sua entrada e, estabelecida a adesão, é através deste ponto que os parasitos se constriem e invadem a célula hospedeira (Besteiro e cols., 2011; Shen e Sibley, 2012). A JM move-se do polo apical para o polo posterior do protozoário, conduzindo-o para a internalização. O parasito exporta a proteína de micronema AMA1 para sua superfície e insere sua proteína de rópria RON2 e outras RON, como receptores na superfície da célula hospedeira. Este evento facilita o tropismo do *T. gondii* por diversos tipos celulares (Lebrun e cols., 2005; Alexander e cols., 2005; Besteiro e cols., 2011; revisto em Shen e Sibley, 2012; revisto em Frénil e Soldati-Favre, 2015).

Entretanto, durante todo esse processo, a membrana da célula hospedeira também participa ativamente, sendo uma de suas funções ativar respostas celulares

aos sinais de invasão, através de vias de sinalização intracelulares. Interações entre antígenos de superfície do parasito com a membrana da célula hospedeira sugerem que o parasito possa regular a sinalização envolvendo receptores de membrana do hospedeiro. Essa hipótese foi sustentada por Stutz e cols. (2012) que mostraram mudanças na expressão gênica de células não infectadas, por fatores secretados pelo parasito, principalmente aqueles secretados pelos micronemas (revisto por Blader e Koshy, 2014).

Atualmente existem 19 tipos de MICs conhecidas: MIC1-12, AMA1, M2AP, SUB1, ROM1, SPATR, PLP1, E TLN4, sendo que 10 (TgMIC1-4, TgMIC6-9, TgMIC12 e SPATR) contém diferentes domínios de adesão semelhantes aos encontrados em proteínas (integrinas, EGF, trombospondinas e lectinas) de vertebrados que reconhecem receptores na superfície das diversas células hospedeiras, como heparan sulfato, proteoglicanas e laminina. A existência destes diferentes complexos sugere que interações moleculares estariam envolvidas na movimentação do parasito através das barreiras biológicas, enquanto outros estariam envolvidos na penetração na célula hospedeira, capacitando o parasito para o reconhecimento de uma maior variedade de receptores, amplificando assim sua gama de hospedeiros (revisto por Wang e Yin, 2015).

Wang e cols. (2014) reportaram pela primeira vez a interação de MIC2 de *T. gondii* com duas proteínas da célula hospedeira, LAMTOR1 e RNaseH2B e sugeriram que MIC2 possa desempenhar importante papel na modulação da transdução de sinais da célula hospedeira, bem como outros processos biológicos além da adesão.

Outra proteína de micronema que tem despertado a atenção é a MIC3. Esta proteína pode se ligar a receptores de ampla variedade de hospedeiros através de seu domínio ligante estrutural, por isso está fortemente associada com o processo de invasão e com a virulência durante a infecção e é expressa em taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos demonstrando excelente resposta imunológica (Wang e Ying, 2015).

Ao mesmo tempo que o *T. gondii* invade a célula hospedeira, seu VP é formado. A JM é importante para propulsionar o parasito para o seu VP, mas também parece estar envolvida na formação e definição da composição bioquímica da membrana do VP. O complexo molecular formado pelas proteínas da JM poderia participar no processo seletivo de proteínas da membrana da célula hospedeira que irão se incorporar à membrana do VP. Por exemplo: proteínas transmembranas do

tipo 1 são excluídas, enquanto proteínas transmembrana ancoradas a glicosilfosfatidilinositol compõem o vacúolo (Charron e Sibley, 2004, revisto em Besteiro e cols., 2011). Essa composição irá contribuir para o desenvolvimento do parasito e também prevenir a fusão com os lisossomos da célula hospedeira (Morisaki e cols., 1995; revisto em Besteiro e cols., 2011), uma vez que essa fusão resultaria na degradação do PV mediada por autofagia (Ling e cols., 2006; revisto em Bladder e Koshy, 2014).

A membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) é bioquimicamente modificada por intensa exocitose de moléculas das róptrias e grânulos densos (Carruthers, 2002). As róptrias fornecem proteínas e lipídeos, através de vesículas, essenciais para a formação da MVP. Estas organelas são enriquecidas em colesterol e fosfatidilcolina e descarregam seus conteúdos durante o processo de invasão (Coppens e Joiner, 2003). Durante o processo de multiplicação do parasito, ocorre aumento significativo da extensão da MVP. Alguns autores atribuem este aumento à incorporação de moléculas provenientes de organelas do hospedeiro como o retículo endoplasmático, mitocôndria e lipídios (de Melo e de Souza, 1997; Sinai e cols., 1997; Gomes e cols., 2014). Ensaios farmacológicos, nos quais o colesterol da membrana plasmática da célula hospedeira foi depletado antes da infecção, revelaram redução na taxa de invasão e formação do VP (Sehgal e cols., 2005).

As proteínas dos grânulos densos (GRA) também participam da modificação do VP, bem como da parede cística derivada do VP e são secretadas logo após a interiorização dos parasitos (Mercier e Cesbron-Delauw, 2015). As GRA são exocitadas tanto durante quanto após a invasão e podem permanecer no lúmen do VP ou estarem associadas tanto à MVP quanto à rede de membranas tubulovesiculares no VP (revisto em Nam, 2009; Mercier e Cesbron-Delauw, 2015).

Após serem secretadas, a localização das GRA tanto no VP quanto na parede do cisto, em conjunto com resultados obtidos de análises fenotípicas de parasitos silenciados para diversos genes de GRA, têm sugerido que as proteínas GRA são importantes na modificação do VP em um compartimento metabolicamente ativo e na sua subsequente transformação em parede cística (Lebrun, 2013; revisto em Mercier e Delauw, 2015).

Nos últimos 10 anos, 16 genes para GRA (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9, GRA12, GRA14, GRA19, GRA20, GRA21, GRA23, GRA25, e suas proteínas codificadas foram caracterizados (Mercier e cols., 2005; 2010; Mercier e Delauw, 2015). Apesar dessas proteínas não apresentarem

homologia entre si ou com outras proteínas de funções conhecidas, elas foram definidas como da família GRA, com base na sua co-localização nos grânulos densos. Entretanto, o proteoma total dos grânulos densos depende da purificação destas organelas, não tendo sido acessado até o momento em nenhum apicomplexa.

Com exceção da GRA1, que foi descrita como proteína solúvel (Cesbron-Delauw e cols., 1989), todas as GRA apresentam um curioso comportamento duplo, por serem parte solúveis e parte associadas à membrana do VP, ou seja, se localizam direta e indiretamente com: (i) a membrana do VP (GRA3, GRA5, GRA7, GRA8, GRA14, GRA19, GRA20, GRA21, GRA23) e suas longas e finas extensões que emergem para o citoplasma da célula hospedeira (Hsiao e cols., 2013; Masatani e cols., 2013); (ii) as estruturas vacuolares da célula hospedeira (GRA7) (Coppens e cols., 2006); ou (iii) a rede de membranas nanotubulares intravacuolares que conectam os parasitos à MVP (GRA2, GRA4, GRA6, GRA9, GRA12) (Mercier e Delauw, 2012). Dentre as proteínas GRA descritas e caracterizadas, a sua maioria é expressa em grande quantidade em taquizoítos e bradizoítos, contribuindo para o desenvolvimento de um VP funcional e para a formação da parede cística. Localizadas na interface parasito-célula hospedeira, algumas dessas proteínas parecem estar envolvidas na modulação de respostas da célula hospedeira, como recém demonstrado para as GRA6 e GRA7 (Ma e cols., 2014; Alaganan e cols., 2014; revisto em Mercier e Delauw, 2015).

Outras proteínas GRA, que podem ser secretadas preferencialmente durante o desenvolvimento de esporozoítos ou durante todo ciclo celular do *T. gondii*, parecem ser secretadas para o VP antes de serem direcionadas para o núcleo da célula hospedeira. Essas proteínas podem contribuir com outras funções essenciais, como a reprogramação da célula hospedeira.

Em outro estudo, Okada e cols. (2013) identificaram uma nova GRA, a GRA22. Parasitos que foram silenciados para esta proteína egressaram da célula hospedeira antes do que a população controle, sugerindo que a GRA22 está envolvida na regulação do egresso do *T. gondii*.

6. Aspectos da diferenciação do *T. gondii*: estudos *in vitro* e *in vivo*

6.1. Cistogênese

A persistência de estágios latentes (cistos) em animais é fator chave de transmissão da doença para humanos. A persistência do parasito envolve pelo menos 3 processos: (i) diferenciação dos estágios multiplicativos rápidos (taquizoítos) em estágios mais lentos metabolicamente (bradizoítos) em um processo conhecido como estágio conversão; (ii) formação de cistos intracelulares e, (iii) longa sobrevivência dos cistos em hospedeiros imunocompetentes (Schlüter e cols., 2014). A diferenciação em organismos unicelulares é um fenômeno temporal, frequentemente associado à alteração das condições ambientais. Para muitos protozoários parasitos, a diferenciação é um processo obrigatório, com diferentes estágios evolutivos dentro do seu ciclo de vida, necessários para o sucesso da transmissão entre hospedeiros (Dzierszinski e cols., 2004).

Dada a importância do desenvolvimento de cistos teciduais nos hospedeiros do *T. gondii* como um dos principais mecanismos de persistência da infecção, diversos trabalhos têm concentrado atenção no desenvolvimento de métodos para melhor compreensão da diferenciação em bradizoítos, embora as bases moleculares para o desenvolvimento desta modificação ainda sejam desconhecidas (White e cols., 2014).

A estágio conversão é associada com a regulação positiva e negativa de vários genes expressos em estágios específicos (Behnke e cols., 2008; Naguleswaran e cols., 2010) que codificam várias proteínas de superfície, proteínas de choque térmico, enzimas em especial da via glicolítica, proteínas secretoras/excretoras, proteínas de parede cística, fatores de transcrição e outros (Manger e cols., 1998; Radke e cols., 2005; Naguleswaran e cols., 2010).

Cepas de *T. gondii* avirulentas do tipo II (VEG, ME49; Beverley, Prugnialud e NTE), produzem cistos teciduais espontaneamente *in vitro* com mais frequência (Lindsay e cols., 1993; McHugh e cols., 1993) e em maior número quando comparadas às cepas virulentas do tipo I (cepa RH e BK) (Bohne e cols., 1994; Bohne e cols., 1999). Os cistos formados *in vitro* são menores e em menor quantidade do que aqueles obtidos *in vivo* (Tomavo e cols., 1991; Bohne e cols., 1994; Gross e cols., 1996).

Alguns estudos sobre a estágio conversão taqui↔bradi propõem que o tipo celular não influencia na formação de cistos teciduais (Lindsay e cols., 1991). Esta proposta é sustentada por resultados mostrados em vários estudos onde a interconversão pode ser induzida *in vitro* por mudanças na temperatura ou no pH do meio (Soète e cols., 1994), por citocinas pró-inflamatórias ou inibidores de

mitocôndria (Bohne e cols.,1994), ou deleção de nutrientes do meio (Fox e cols., 2004). Soete e cols. (1994) detectaram antígenos específicos para bradizoítos (BAG-1) e formação de estruturas císticas em culturas celulares das linhagens Vero e HFF infectadas com *T. gondii* (cepa RH), quando submetidas a estresse físico e metabólico.

Ferreira e cols. (2009a,b) empregando células musculares esqueléticas sugeriram que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes na formação de cistos. As culturas primárias de células musculares esqueléticas foram infectadas com taquizoítos de cepa virulenta tipo I (RH) e verificou-se a conversão de taquizoíto para bradizoíto na ausência de estímulos exógenos de estresse. Além disso, linhagens de células musculares mostram ser mais eficientes na capacidade de conversão de taquizoítos para bradizoítos quando comparadas às culturas de fibroblastos, reforçando a idéia de que o fenômeno de conversão do *T. gondii* está certamente associado a outros fatores, como por exemplo, o nicho celular onde a infecção se estabeleça (Ferreira-da-Silva e cols., 2008, 2009a,b).

Células HeLa e células L (fibroblastos), infectadas com taquizoítos de *T. gondii* cepas RH e Beverley, demonstraram a conversão espontânea para bradizoítos e formação de cistos teciduais. E ainda, estes cistos foram infectivos para gatos jovens, levando à produção de oocistos. Esses resultados indicam que cistos teciduais produzidos *in vitro* são biologicamente iguais aos produzidos *in vivo* (Matsubayashi e Akao, 1963).

A descoberta de antígenos estágio-específico, e conseqüente produção de anticorpos contra esses antígenos, favoreceram os estudos da cistogênese *in vitro*, com cepas avirulentas (tipos II e III) de *T. gondii* (Weiss e Kim, 2000) e dos mecanismos de conversão *in vitro* do parasito (Bohne e cols., 1993; Lindsay e cols., 1993; McHugh e cols., 1993; Soete e cols., 1993; Bohne e cols., 1994; Gross e Bohne, 1994; Soete e cols., 1994; Gross e cols., 1996; Sahm e cols., 1997; Guimarães e cols., 2008).

O emprego do anticorpo CC2 específico para parede cística possibilitou identificar cistos teciduais em cultura de astróctios e de neurônios de tecido de feto humano, com a cepa ME49 (Halonen e cols., 1996). Em sistemas *in vivo*, quando bradizoítos são inoculados em camundongos por qualquer via, o período mínimo para formação de cistos teciduais biologicamente funcionais é de 6 dias pós-infecção (Dubey e Frenkel, 1976). Outros ensaios *in vivo* demonstraram que todos os bradizoítos convertem para a forma taquizoíta após 18 horas pós infecção e

foram negativos para o antígeno BAG-5, que reconhece especificamente antígenos de bradizoítos, 48 horas pós infecção (Dubey, 1997).

Weiss e colaboradores (1995) usaram o anticorpo anti-BAG5 e observaram a formação de cistos três dias pós-inóculo de estágios bradizoítos da cepa ME49 em fibroblastos humanos. Os autores sugerem neste artigo que alguns bradizoítos formem cistos teciduais diretamente sem conversão transitória em taquizoíto, como também descrita por Guimarães e colaboradores (2008, 2009), empregando células musculares esqueléticas.

Weilhammer e cols. (2012) ao demonstrarem a formação de cistos *in vitro* em fibroblastos HFF e células Vero, mostraram a influência da célula hospedeira no processo de encistamento. Paredes-Santos e cols. (2013) observaram que células epiteliais LLC-MK₂ após 4 dias de infecção com taquizoítos da cepa EGS formaram cistos de forma espontânea em maior quantidade quando comparadas com fibroblastos HSFS e linhagem de células da glia.

6.2. Ciclo enteroepitelial

A indução do ciclo sexuado por bradizoítos *in vivo* foi bem estudada, sendo descrito que os felinos que ingeriram cistos teciduais desenvolveram os estágios enteroepiteliais e formaram oocistos (Dubey e Frenkel, 1972; Hill e Dubey, 2002). Os estudos desenvolvidos por Dubey e Frenkel (1998) indicam que o ciclo sexuado é mais curto e a quantidade de liberação de oocistos é maior quando os felinos ingerem cistos teciduais ou bradizoítos. Estudos prévios mais recentes demonstraram o desenvolvimento de formas estruturais com características semelhantes às formas esquizontes de *T. gondii* em culturas de enterócitos de felinos *in vitro*, observadas por microscopia óptica (Moura e cols., 2009). Essa lacuna na biologia do parasito se reflete diretamente na ausência de medidas de controle da toxoplasmose em felídeos. Além do pouco conhecimento a respeito do ciclo enteroepitelial do parasito, os mecanismos moleculares que regulam a sua diferenciação durante seu ciclo sexuado ainda não estão bem esclarecidos. O desenvolvimento de um modelo celular para o estudo do ciclo sexuado do *T. gondii*, ainda é um grande desafio.

6.2.1. Linhagens celulares

Nas últimas décadas, a utilização de linhagens celulares representou um grande avanço mundial em vários aspectos: no custo dos experimentos, rapidez na obtenção dos resultados e ainda, evitando sacrifício de animais (Balls, 2007). Há uma carência de linhagens celulares de animais de grande porte, animais silvestres e domésticos, quando comparado às linhagens de animais de laboratório, mais especificamente quando se considera linhagens de origem intestinal (Golaz e cols., 2007).

Nos últimos anos, culturas celulares epiteliais de cólon, oriundas de neoplasias, têm sido consideradas como os sistemas intestinais mais favoráveis para o cultivo, pois podem ser mantidas por um longo período de tempo (3-4 meses). No entanto, alguns processos fisiológicos e fisiopatológicos do intestino grosso *in vivo*, não são mimetizados nestes sistemas (Bartsch e cols., 2004). Objetivando reproduzir os eventos celulares que ocorrem *in vivo* foram estabelecidas culturas primárias de células epiteliais diferenciadas (adultas) de cólon de camundongos (Booth e cols., 1995; Tabuchi e cols., 2000), ratos (Ahnen e cols., 1988; Traber e cols., 1991; Schörkhuber e cols., 1998) e homem (Whitehead e cols., 1987; Baten e cols., 1992; Stauffer e cols., 1995; Pedersen e cols., 2000). A principal limitação de culturas primárias de células intestinais é o curto período de cultivo (na maioria dos casos 7 a 14 dias) (Bartsch e cols., 2004).

Alternativamente, uma série de linhagens celulares derivadas de adenomas de cólon (Paraskeva e cols., 1984; Van Mouwerik e cols., 1987) e carcinomas (Leibovitz e cols., 1976; Fogh e cols., 1977) tornaram-se disponíveis. Porém, em função dessas linhagens serem derivadas de tumores, são ainda portadoras de diversas alterações genéticas que impossibilitam vários estudos comparativos *in vitro*, como por exemplo, as linhagens intestinais de adenocarcinoma de cólon humano (HT29, Caco-2, T84) (Bartsch e cols., 2004).

Linhagens de epitélio de intestino delgado de ratos, provenientes de amostra fetal, como IEC-6, IEC-18 e RIE-1 foram estabelecidas há pelo menos três décadas. Estas linhagens apresentam características morfofisiológicas preservadas do epitélio intestinal *in vivo*, trazendo vários avanços nos estudos *in vitro* da fisiopatologia intestinal (Quaroni e cols., 1979; Quaroni, 1986; Browning e Lees, 1994). Sendo assim, a introdução dessas linhagens epiteliais intestinais de origem não neoplásica representou um avanço nessa linha de pesquisa, pois além da manutenção das características do tecido original, apresentam um taxa de apoptose inferior às linhagens derivadas de células do intestino grosso (Potten e Grant, 1998).

Apesar de vários estudos relacionados à produção de vacinas e cultivos virais em linhagens celulares de felinos (Lehmann e cols.,1992a; Lehmann e cols.,1992b), poucas estão disponíveis para uso em pesquisas. Podemos destacar as linhagens de macrófagos FCWS-4 (Jacobse-Geels e Horzinek, 1983); linfoblastos: NCE-F161 (Allison e Gregoriadis, 1990), FeLV-3281 (Donahue e cols.,1988), MYA-1 (Miyazawa e cols.,1992) e FL74-UCD-1 (Pedersen e cols.,1979); linfócitos T: FeT-J e FeT-1c (Yamamoto e cols.,1998); células da glia: PG-4 (S+L-); astrócitos G355-5 (Haapala e cols.,1985) e fibroblastos Fc3Tg (Nelson-Rees e cols.,1972). Na ausência de linhagens intestinais de felinos disponíveis em bancos de células, linhagens epiteliais são os modelos mais próximos para estudos comparativos morfofisiopatológicos intestinais, e para isso temos disponível duas linhagens: epitélio hepático AK-D (Cantin e Woods, 1993) e epitélio renal CRFK (Crandell e cols.,1973).

Os aspectos ultraestruturais da interação taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* e a célula hospedeira, assim como, aspectos comparativos entre essas interações frente às células epiteliais de diferentes origens, poderão fornecer subsídios para o melhor entendimento do seu ciclo entérico em felídeos. A revelação do comportamento dessas duas formas infectivas frente às células de origens distintas pode confirmar ou não se o tipo celular tem um papel decisivo neste processo.

6. Culturas primárias de células intestinais

Culturas primárias de células intestinais permitem estudar os mecanismos envolvidos nas patologias intestinais, incluindo as causadas por agentes infecciosos que afetam a integridade celular (Evans e cols., 1994). Recentemente, alguns trabalhos relataram o estabelecimento e a caracterização de cultivos primários intestinais de animais domésticos (Follmann e cols., 2000; Birkner e cols., 2004; Rusu e cols., 2005; Kaushik e cols., 2008; Weng e cols., 2005; Golaz e cols., 2007; Badylak e cols.,1998; Lindberg e Badylak, 2001; Desmarets e cols., 2013; Worliczek e cols., 2013). Em linhas gerais, estas culturas são de difícil obtenção, pois essas células dependem fundamentalmente da interação célula-célula e/ou célula-matriz, além de diversos fatores de crescimento (Aldhous e cols., 2001). Porém, vários pesquisadores já desenvolveram métodos de cultivo de células intestinais de diversas espécies animais, a partir de células primárias normais (Rusu e cols.,

2005). Algumas estratégias têm sido utilizadas na tentativa de se estabelecer um cultivo intestinal homogêneo em monocamadas, empregando células intestinais obtidas de fragmentos de animais adultos (Macartney e cols., 2000; Aldhous e cols., 2001) ou células fetais (Quaroni, 1985a; Perreault e Jean-Francois, 1996; Sanderson e cols., 1996). A principal dificuldade com cultivos celular de animais adultos é que após a remoção das células da membrana basal adjacente, o processo de apoptose é iniciado dentro de poucas horas, inviabilizando estudos de longa duração (Potten e cols., 1994; Strater e cols., 1996).

A introdução de fatores de crescimento (EGF, insulina, hidrocortisona, aminoácidos não essenciais) ou a interação desses sistemas com a matriz extracelular permitiu o desenvolvimento de técnicas experimentais para estudar *in vitro* da diferenciação das células em cultura (revisto em Simon-Assmann e cols., 2007; Chopra e cols., 2010; Desmarests e cols., 2013). Em culturas primárias de epitélio intestinal obtidas de fetos de ratos de 14 a 15 dias foram observadas células epiteliais cubóides, com localização basal do núcleo e a presença de vilos em uma das faces do lúmen (Kedinger e cols., 1987). Áreas de especialização de membrana foram identificadas com formação de conexões do tipo zônulas de oclusão e de adesão além de desmossomos na região subluminal e microvilos que se projetavam na face do lúmen, indicando que as células em cultura mantinham a capacidade de absorção (Fukamachi, 1992). Fragmentos pequenos (1-4 mm²) de explantes de tecidos de fetos de várias espécies podem ser mantidos por até 3 semanas, permitindo a investigação do crescimento, diferenciação e transporte de íons através do epitélio (Chopra e cols., 2010). Esses avanços permitiram a aplicação de culturas de enterócitos para estudos de interação com enteroparasitos *in vitro* (Evans e cols., 1994; Desmarests e cols., 2013), como o *T. gondii* (Moura e cols., 2009).

Os mecanismos que regem a diferenciação do *T. gondii* em células epiteliais, as lacunas no conhecimento do ciclo sexuado e a ausência de modelos celulares *in vitro* que permitam explorar o ciclo entérico desse parasito no hospedeiro definitivo, os felinos, direcionaram os objetivos desta tese que serão apresentados a seguir.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a interação do *Toxoplasma gondii* e células epiteliais de felinos *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar comparativamente a suscetibilidade de epitélio renal de felinos (CRFK), epitélio intestinal de ratos (IEC-6), epitélio renal de macaco (Vero) e cultura primária de enterócitos de felinos (CEIF) à infecção por bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) com diferentes cargas infectivas (**Artigo 1, tópico 2 e Resultados complementares**);
2. Caracterizar o destino intracelular de bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) em células epiteliais de diferentes tecidos e origens (**Artigo 1, tópico 2 e Resultados complementares**);
3. Caracterizar a CEIF morfológica e funcionalmente (**Tópico 2**);
4. Estabelecer *in vitro* o ciclo enteroepitelial do *T. gondii* (**Capítulo de livro e Tópico 2**).

3.1. ARTIGO 1

O artigo “Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*” foi resultado do desenvolvimento dos objetivos 1 e 2:

1. Avaliar comparativamente a suscetibilidade de epitélio renal de felinos (CRFK) e epitélio intestinal de ratos (IEC-6) à infecção por bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) com diferentes cargas infectivas;
2. Caracterizar o destino intracelular de bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) em células epiteliais de diferentes tecidos e origens.

Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*

Renata M. de Munro¹, Marcos A. Moura¹, Luciany C. de Carvalho¹, Sergio H. Seabra² and Helene S. Barbosa¹

¹Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

²Laboratório de Tecnologia em Cultura de Células, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, RJ, Brazil

Abstract: *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1908 is an obligate intracellular parasite with the ability to infect mammals and birds. The only definitive hosts for *T. gondii* are felids, as the parasites form immature oocysts that are shed in the faeces. Here we introduce cat cells as a model for the study of experimental toxoplasmosis. We selected epithelial cells derived from cat kidneys (CRFK) as a target to determine the intracellular fate of bradyzoites of the *T. gondii* ME49 strain. In parallel, we compared this infection using epithelial cells from the rat intestine (IEC-6), considering the enteroepithelial development that occurs in the cat. Different ratios of parasites to host cells were assayed over the course of a 14-day-infection. The intracellular development of *T. gondii* was dependent on the source of the epithelial cells and also on the parasite/host cell ratio. Cystogenesis was well established in the CRFK cell line at a ratio of 1 : 10 after 10–14 days of infection. This cellular model system opens a new field of investigation into the molecular aspects of the interactions between *T. gondii* and feline epithelial cells. The CRFK cell line appears to be a potential cellular model for large scale cyst production *in vitro*, which would allow a reduction in the number of animals used and/or replacement of animals by *in vitro* cultures.

Keywords: bradyzoites, felids cells, tachyzoites, tissue cysts *in vitro*, toxoplasmosis

Toxoplasma gondii Nicolle et Manceaux, 1908, an intracellular apicomplexan parasite, infects different species of mammals and birds (Dubey 1998). Asexual reproduction of the parasite takes place in these animals, which serve as intermediate hosts (Black and Boothroyd 2000, Lehman et al. 2000). Cats and other felids are the only hosts that directly spread *T. gondii* in the environment and are responsible for the enteroepithelial stage of the parasite (Dubey et al. 2004). These animals are considered definitive hosts and the processes of schizogony, gametogony and sporogony take place in their intestinal epithelia, resulting in the formation of immature oocysts that are eliminated with their faeces (Dubey and Frenkel 1972, 1973, Dubey 1973, Dubey et al. 1998). The mechanisms by which the enteroepithelial cycle in felids is induced are still unknown.

The morphological characterization of the coccidian cycle of *T. gondii* in the gut of neonatal cats has been undertaken in *in vivo* systems (Dubey and Frenkel 1972, Ferguson et al. 1974, 1975, Speer and Dubey 2005, Ferguson 2009), and several molecular aspects of this process have been explored (Ferguson 2004). Due to the difficulty of using cat as an experimental model, these studies have not progressed very far, and alternative models will have to be introduced to facilitate further investigations.

Recently, our group has developed a protocol for obtaining feline enterocytes from primary cultures and their subsequent maintenance (Moura et al. 2009). This system provides a potential alternative approach for the study of *T. gondii*-host cell interactions. Our initial studies found intracellular parasites that were very similar to the schizonts of *T. gondii* that have been described *in vivo*. This first step opened up the possibility that the enteroepithelial development of *T. gondii* could also be explored *in vitro*.

Feline intestinal cell lines in cell banks are absent and there are only two felid epithelial cells lines: AK-D liver epithelium (Cantin and Woods 1930) and renal feline kidney cells (CRFK line) (Crandell et al. 1973). Intestinal epithelial cells lines, such as the IEC-6 isolated from rats, are alternative cellular models for parasite life cycle studies, and they can be employed for comparisons with the feline epithelial CRFK cells. The morphological aspects of the bradyzoite-host cell interactions and the use of epithelial cells from different sources may provide a basis for a better understanding of the intracellular development of *T. gondii* in these cells. We are pioneering the use of cat cells, specifically the CRFK cell line, to study its interaction with bradyzoites of *T. gondii*. The introduction of this cell line has the potential to contribute new insights into our understanding of the cell biology of *Toxoplasma*.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were carried out in accordance with the guidelines established by the Fundação Oswaldo Cruz, Committee of Ethics for the Use of Animals, resolution 242/99, by license CEUA LW 10/10, and by the Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents (NACLAR).

Epithelial cell lines

CRFK from normal epithelial tissue from the renal cortex of *Felis catus* Linnaeus, 1758 (domestic cat) (BCRJ N° CR0268) and IEC-6 from normal epithelial tissue from the intestines of rats (BCRJ N° AP003) were used. The cells were acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br>).

CRFK and IEC-6 were plated at a concentration of 1.0×10^5 cells/ml in 25 cm³ bottles (Gibco BRL, Paisley, UK) in DMEM/Hams F12 medium (1 : 1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) containing a 1% antibiotic solution (Sigma-Aldrich) and 10% bovine fetal serum. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Every two days, half of the medium was discarded and the same volume of fresh medium was added. The cells were cultivated until they reached approximately 80% confluence. At this point, the cells were treated for 10 min at 37°C with dissociation solution (PBS with 0.01% EDTA and 0.25% trypsin). After dissociation, the cells were placed in culture medium at 4°C with 10% bovine fetal serum to inhibit the action of trypsin, centrifuged for 7 min at 650 g at 4°C and grown in 24-well plates on coverslips (8×10^4 cells/well).

Isolation of tissue cysts and bradyzoites

Toxoplasma gondii cysts from the ME-49 strain (Type II) were inoculated intraperitoneally into C57BL/6 female mice (15–18 g) with 50 cysts/animal. After 4 and 12 weeks post-infection, the mice were sacrificed and the brain cysts were isolated as described previously (Freyre 1995, Popiel et al. 1996; Guimarães et al. 2007, 2008). Bradyzoites were obtained from the isolated tissue cysts (Guimarães et al. 2008).

Interaction of *T. gondii*-epithelial cell lines

Confluent CRFK and IEC-6 cultures were infected with *T. gondii* bradyzoites. The assays were performed at ratios of 1 : 5, 1 : 10 or 1 : 20 (parasite-host cell) for periods ranging from 1 to 4 days to analyse the course of infection and also to evaluate the parasites' intracellular fate. After the interaction periods, the cells were washed in PBS and further processed for subsequent experiments. The ability of *T. gondii* bradyzoites to infect host cells *in vitro* was analysed after fixation in Bouin's solution and Giemsa staining. The percentual of infection was quantified after 24–96 h using 400 cells per coverslip, in three independent experiments, each one performed in duplicate and analysed by two independent observers. The analysis was performed using an Axioplan 2 Zeiss microscope. The quantitative data were expressed as the mean \pm standard error and the results were statistically analysed using the Student-Newman-Keuls test. The differences were considered statistically significant when the *p* values were < 0.05 .

Characterization of *T. gondii* stages by immunolabeling

CRFK cells infected with *T. gondii* bradyzoites (1 : 10 parasite-host cell ratio) were used for this analysis. The differentiation of intracellular parasites was monitored using stage-specific antibodies and lectin. Tachyzoites were identified by immunostaining with anti-SAG-1 antibodies and cysts of *T. gondii*

were identified with lectin DBA conjugated to TRITC (Sigma-Aldrich, L6533), which binds to N-acetyl-galactosamine groups (Zhang et al. 2001). Initially, the cultures were fixed with 4% PFA in PBS for 10 min at 4°C on different days (1–4, 6, 10, 11 and 13), washed three times for 10 min in PBS and then, were incubated for 30 min in 50 mM ammonium chloride to block free aldehyde radicals.

After these steps, the cells were permeabilized for 20 min with a PBS solution containing 0.05% Triton X-100 (Roche, Rio de Janeiro, Brazil) and 4% BSA (Sigma-Aldrich) to block non-specific binding.

For the indirect immunofluorescence assays, the host cells were incubated for 2 h at 37°C with an anti-SAG-1 primary antibody diluted 1 : 200 in PBS/BSA. After this incubation, the cells were washed with PBS containing 4% BSA and incubated for 1 h at 37°C with the secondary antibody at a dilution of 1 : 1000 (anti-mouse IgG conjugated with FITC-F5262).

For direct fluorescence, the cells were incubated for 1 h at room temperature with DBA lectin-TRITC (1 : 200 dilution) in PBS. Next, the cultures were washed 3 times for 10 min in PBS, incubated for 5 min in 0.1 μ g/ml with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, which intercalates in DNA, Sigma-Aldrich) and diluted 1:10000 in PBS. After the PBS wash, the coverslips were mounted on slides with a solution of 2.5% DAPI-BCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane-triethylenediamine, anti-fading, Sigma-Aldrich) in PBS containing 50% glycerol, pH 7.2. Controls were performed by omission of the primary antibody, and for DBA, a competitive reaction with the addition of 50 mM N-acetyl-galactosamine (GalNAc) was carried out.

The samples were examined with a confocal laser-scanning microscope (CLSM Axiovert 510, META, Zeiss, Germany) using a 543 Helium laser (LP560 filter), 488 Argon/Krypton laser (Ar/Kr) (filter LP515) and a 405 Diiod laser (LP 420 filter). The analysis of the cystogenesis establishment was carried out monitoring a total of 100 infected cells per coverslip of three independent experiments, in duplicate, at interaction times of 24 h to 13 days using a Zeiss microscope Axio Imager A2. This methodology is based on labeling of infected cells with DBA, which has high affinity for cyst wall protein.

Ultrastructural analysis

For ultrastructural studies, CRFK cell cultures infected with *T. gondii* bradyzoites (1 : 10 parasite-host cell ratio) were used. This parasite-host cell ratio increased the incidence of intracellular cysts *in vitro* as demonstrated by kinetic studies. Both the cells and supernatants obtained from 3 to 14 days of infection were washed 3 times for 10 min with PBS and fixed for 1 h at 4°C in 2.5% glutaraldehyde diluted in a 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 3.5% sucrose and 2.5 mM CaCl₂ (pH 7.2). After fixation, the cells were washed in the same buffer and then post-fixed for 30 min at room temperature in 1% osmium tetroxide diluted in a 0.1 M cacodylate buffer.

For transmission electron microscopy (TEM) analysis, the cells were washed in the same buffer, scraped from the plastic dish at 4°C and centrifuged for 5 min at 10000 g. The cells were then dehydrated in graded acetone and embedded in an epoxy resin (PolyBed 812). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined under a transmission electron microscope (Jeol JEM1011).

For scanning electron microscopy (SEM), the infected cell cultures were fixed for 30 min at room temperature with 2.5%

glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) and post-fixed for 30 min at room temperature with a solution of 1% OsO₄ containing 2.5 mM CaCl₂ in the same buffer. The cells were dehydrated in an ascending acetone series and dried by the critical point method with CO₂ (CPD 030, Balzers, Liechtenstein, Switzerland). The monolayer was gently scraped with scotch tape (Flood 1975) to expose the cytoplasmic face of the cells. The scraped portion of the cells, which remained adhered to the tape, was also observed. The samples were mounted on aluminum stubs, coated with a 20 nm layer of gold and examined in Jeol JSM6390LV and JSM 6490LV scanning electron microscopes (Tokyo, Japan). The samples were analysed at the Electron Microscopy Platform of the Instituto Oswaldo Cruz and Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

RESULTS

Infection of IEC-6 and CRFK cells with *Toxoplasma gondii* bradyzoites of the ME-49 strain

Quantitative analysis of the interaction between *T. gondii* bradyzoites (ME49) and IEC-6 cells using an infective load of 1 : 5 (parasite-cell) showed that the average number of infected IEC-6 cells remained almost constant until 72 h post-infection. After this period, there was a slight decline in the number of infected cells. In contrast, analysis of the CRFK line showed an increase in the average number of infected cells, especially after 48 h of infection (Table 1).

Quantitative analysis of *T. gondii* bradyzoites in IEC-6 and CRFK cultures using lower infective loads (parasite-cell ratios of 1 : 10 and 1 : 20) also showed statistically significant ($p \leq 0.05$) differences between the infections of host cells (Table 1). The kinetic study of IEC-6 cells during 48 h of infection showed several parasitophorous vacuoles per cell with only one parasite inside (Fig. 1A). After 72 h of infection, several cells contained intracel-

lular cyst-like structures (Fig. 1B), but the presence of rosettes among infected cells during the same period was more frequent (Fig. 1C). After 96 h, several cells showed vacuoles containing only one parasite in a panel of only a few infected cells, as illustrated in Figure 1D.

Table 1. Mean of proportion (in %) of IEC-6 and CRFK infected with *Toxoplasma gondii* bradyzoites of the ME-49 strain using different infection ratios.

Infection ratio	Cell line	Hours post infection			
		24	48	72	96
1 : 5	IEC-6	10.5 ± 3.2 ^a	12.7 ± 6.9 ^a	14.8 ± 2.8 ^a	8.8 ± 5.4 ^a
	CRFK	12.8 ± 3.5 ^a	23.2 ± 4 ^{a*}	55.8 ± 11.8 ^{a*}	84.2 ± 31.3 ^{a*}
1 : 10	IEC-6	4.8 ± 0.75 ^a	11.2 ± 6 ^a	9.8 ± 1.94 ^a	12.7 ± 5.2 ^a
	CRFK	6.3 ± 1.2 ^a	17.3 ± 10 ^{a*}	55.3 ± 4.5 ^{a*}	68.7 ± 13 ^{a*}
1 : 20	IEC-6	6.9 ± 13 ^a	7.0 ± 2.1 ^a	8.2 ± 4.3 ^a	9.6 ± 2.1 ^a
	CRFK	0.8 ± 0.5 ^{a*}	2.8 ± 1.7 ^{a*}	14.8 ± 4.2 ^{a*}	33.5 ± 3.4 ^{a*}

^amean ± SD of at least three independent experiments; * significant difference ($p < 0.05$) between IEC-6 and CRFK at the same conditions.

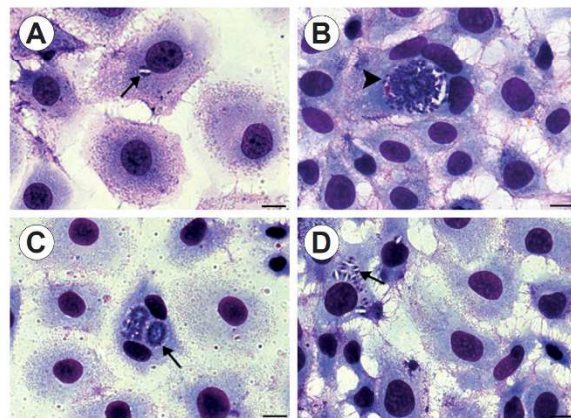


Fig. 1. IEC-6 cell culture infected with *Toxoplasma gondii* bradyzoites of the ME49 strain. **A** – cells with parasitophorous vacuoles (PV) containing few parasite in each PVs at 48 h of infection (arrow). **B, C** – after 72 h, ‘cyst-like’ structures were observed (arrowhead), but most of the structures were rosettes as seen in C (thin arrow). **D** – after 96 h, parasites were observed in couples inside the same cell (thick arrow). Scale bars = 20 µm.

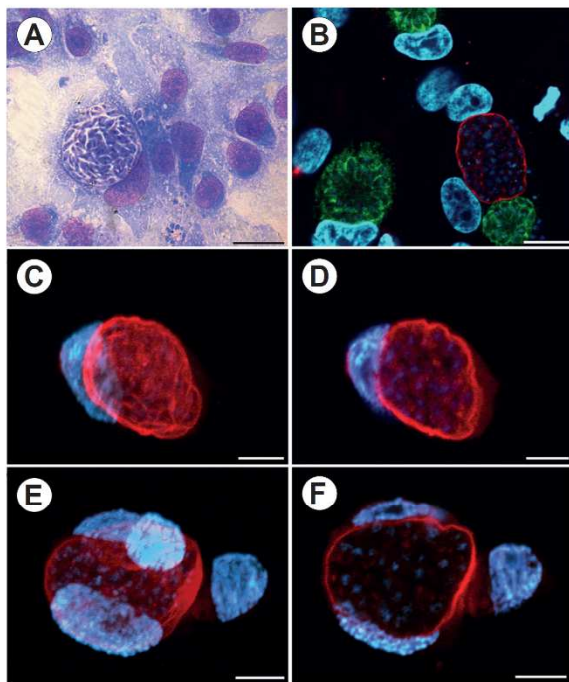


Fig. 2. Interaction of *Toxoplasma gondii* ME49 bradyzoites and CRFK cells at an infection ratio of 1 : 10 (parasite-host cell). **A** – formation of cystic structures 96 hpi stained with Giemsa and a few parasites in neighbouring cells; **B** – presence of *T. gondii* cysts revealed by lectin DBA-TRITC; the nuclei of parasites are in blue due to the DAPI stain and tachyzoites are in green as revealed by the anti-SAG-1 antibody; **C–F** – cysts of *T. gondii* in CRFK cells after 13 days of infection; reconstruction and sectioning of the same cyst revealed by TRITC-DBA lectin clearly showing the cyst wall and the nuclei of the parasites in blue (C,D); reconstruction and sectioning of other cysts revealed by TRITC-DBA lectin and the nuclei of parasites and the nuclei of the host cells in blue (E,F). Scale bars: A = 20 µm; B = 10 µm; C–F = 5 µm.

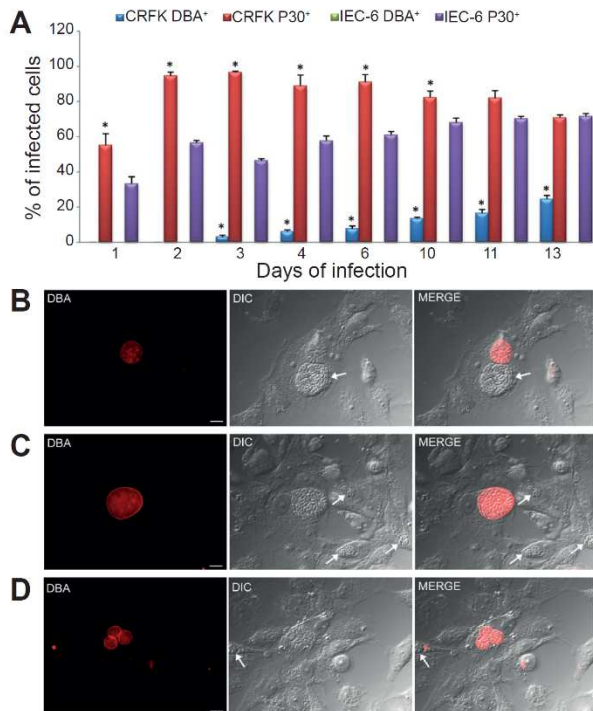


Fig. 3. *Toxoplasma gondii* cysts from 1 to 13 days post infection. **A** – percentage of infected CRFK and IEC-6 cells DBA⁺ and P30⁺; asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) between IEC-6 and CRFK at same conditions; **B–D** – cysts of *T. gondii* were confirmed in CRFK by DBA⁺ staining. Scale bars = 10 μ m.

At an even lower infective load (1 : 20 parasite-cell ratio), the average number of infected IEC-6 cells was lower than the average observed with CRFK after 72 h (Table 1). The analysis of the CRFK line, unlike the IEC-6 cells, showed a trend of increasing infection during the periods analysed, demonstrating that the differences in susceptibility between these cell lines were independent of the parasite-cell ratio used.

During the analysis of bradyzoite infectivity in CRFK and IEC-6 cells, parasitic structures similar to *T. gondii* cysts were observed. The CRFK cell line produced more cyst-like structures than the IEC-6 cell line, especially after 72 h of infection (Fig. 2A).

Cystogenesis in CRFK cultures

Assays for the detection of cysts in CRFK and IEC-6 lines were performed by incubation with the lectin DBA-TRICT. CRFK line demonstrated cystogenesis after 72 h of infection with bradyzoites at a ratio of 1 : 10 (Figs. 2B–F, 3A). Tachyzoites were identified using an anti-SAG-1 primary antibody. There was a high incidence of cells that had established the lytic cycle and of parasites that had undergone conversion from bradyzoite to tachyzoite (Fig. 3A). The presence of cells containing cysts was spontaneous and was independent of chemical or physical maneuvers that induced cystogenesis. In

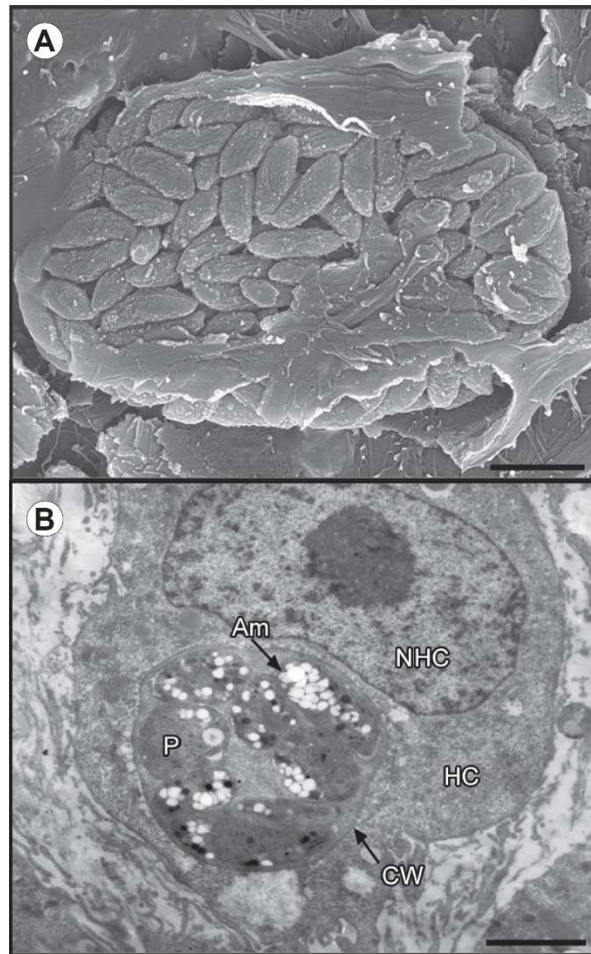


Fig. 4. Cysts of *Toxoplasma gondii* in CRFK cells at 13 days post infection. **A** – intravacuolar structures of various sizes containing parasites with overlapping features such as cysts. **B** – Cyst (CW) near the nuclei of host cell (NHC) containing parasites (P) with a large number of amylopectin granules (Am). Scale bars: A = 5 μ m; B = 1 μ m.

11-day-old cultures, incubation with the P30 antibody revealed infected cells containing cysts, and some were filled with tachyzoites arranged as rosettes (Fig. 2B). Figure 3B–D illustrates the cystogenesis of *T. gondii* maintained for 13 days, showing CRFK line containing one or more cysts.

Ultrastructural characterization of cystogenesis in CRFK cells

CRFK cultures were processed for SEM and scraped with scotch tape after 13 days of infection. These cells showed intravacuolar structures of various sizes, which contained parasites with overlapping features, such as cysts, indicating that *T. gondii* cystogenesis had spontaneously established itself (Fig. 4A). These structures presented several characteristics similar to cysts, such as the membrane modification forming the cystic wall and

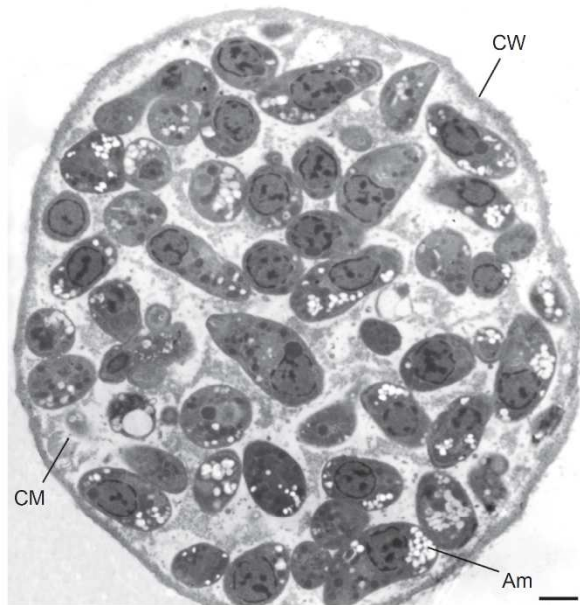


Fig. 5. A cyst of *Toxoplasma gondii* released into the supernatant culture after 14 days of infection. Abbreviations: Am – amylopectin granules; CM – cystic matrix; CW – cyst wall. Scale bar = 1 μ m.

the high electron density of the cystic matrix. Intracystic parasites presented a large amount of amylopectin granules (Fig. 4B).

After 14 days of infection, we were able to identify *T. gondii* cysts containing several parasites with a large quantity of amylopectin granules, characteristic of the bradyzoite forms, and a thick electron-dense cyst wall (Fig. 5).

DISCUSSION

This article presents two findings with respect to the *Toxoplasma gondii*-host cell interaction: the use of a feline cell lineage and of bradyzoite forms. The rationale for utilizing bradyzoites as the source of infection of CRFK and IEC-6 lines is that the natural route of transmission of *T. gondii* occurs through the consumption of raw meat contaminated with cysts. Studies using *in vitro* bradyzoite infections are not often used, likely because the isolation and purification involve a long process and require a reasonably large number of animals.

The difficulty in reproducing the *in vivo* morphological characterization of the enteric cycle of *T. gondii* *in vitro* requires continued euthanasia of cats (today prohibited; see Ferguson 2009 for review). New laws imposed to protect animals have led to the search for alternative models.

Most of the *in vitro* studies examining tachyzoite-bradyzoite conversion in cell lines were developed because of the ease of cell growth and their long survival time in monolayers. However, the cell type where cystogenesis occurs *in vivo* has not been considered in

this choice (Lindsay et al. 1991, McHugh et al. 1993). Recently, our group employed skeletal muscle cells to target the establishment of cystogenesis *in vivo*, and our data strongly suggested that factors inherent in the cell type may be crucial for cyst formation (Ferreira da Silva et al. 2008, 2009a,b).

When bradyzoite forms were used as a source of infection for CRFK and IEC-6, the CRFK line was statistically more susceptible to infection by the bradyzoites than the IEC-6 line suggesting that this characteristic may be a function of the properties of an intestinal cell once these cells produce pro-inflammatory cytokines.

Dubey (2006) compared the infectivity of oocysts and bradyzoites in cats *in vivo* using different dosages of the parasite stages. The results showed that bradyzoites were more infective than oocysts regardless of the dose, demonstrating that infection was stage-dependent. That study also showed that bradyzoites were more pathogenic for cats than for mice, suggesting that both the infective stage and the intermediate host are determinants of the pathogenicity of *T. gondii*.

Our results using bradyzoites as the source of infection have shown that feline cells are more susceptible to infection than rat cells, and they induce spontaneous cystogenesis *in vitro* after 72 hours of infection. These results suggest that the fate of intracellular parasites may be modulated by the infective stage such as bradyzoites, and also by the host cell, in this case feline cells.

In addition, the formation of these cystic structures *in vitro* was dependent not only on the parasite strain and cell type but also on the infection load used. Previous studies using primary cultures of feline enterocytes infected with bradyzoites of the ME49 strain *in vitro* revealed that these cells were more susceptible to infection than the CRFK and IEC-6 cell lines, and enterocytes also showed a larger number of cystic forms when infected at a parasite-cell ratio of 1 : 10 (Moura et al. 2009). These data can be further explained by the molecular and physiological characteristics of the preserved tissue *in vivo*.

After 10 days of infection in CRFK cells, *T. gondii* cysts were identified by lectin DBA staining, which binds specifically to the sugar N-acetyl-D-galactosamine present in the cyst wall, as previously demonstrated by Matsubayashi and Akao (1963), Weiss and Kim (2000) and Dzierszynski et al. (2004). In addition, *Toxoplasma* stage differentiation is largely viewed as a stress-related response to environmental conditions, such as exogenous stress factors, i.e. alkaline pH, IFN- γ and other proinflammatory cytokines, chemicals or drugs, heat shock and deprivation of nutrients (reviewed in Ferreira da Silva et al. 2008).

In contrast, some authors consider spontaneous cystogenesis to be dependent on the strain of *T. gondii* and propose that avirulent strains, such as ME49, possess the ability to form cysts naturally in mammalian cell cultures (Darde et al. 1989, Lindsay et al. 1991, McHugh et al.

1993, Fischer et al. 1997, Ferreira da Silva et al. 2009a,b). This question has not been fully clarified. In a recent paper, we reviewed data on *T. gondii*-skeletal muscle cell interactions and presented compelling data suggesting that the cell type is one of the factors determining the fate of the intracellular parasite (Ferreira da Silva et al. 2008).

Toxoplasma gondii cysts were also seen by transmission electron microscopy, and the presence of cysts was confirmed by the observation of parasites containing large numbers of amylopectin granules and a high electron-dense membrane surrounding the parasites. These structures were similar to those involved in the formation of a cyst wall, especially after 10 days of infection. However, different results can be found in the literature, ranging from 6–7 days (Shimada et al. 1974, Hoff et al. 1977), 20–21 days (Hogan et al. 1960) or up to 40–80 days as described by Jones et al. (1986), depending on the method used to evaluate the kinetics of *in vitro* cystogenesis.

These differences may be related to the virulence of the strains and the infective stage of the parasite used in the experiments. The rate of conversion between the infective stages and the quantity of cysts generated *in vitro* have been related to the strain of *T. gondii* – McHugh et al. (1993), Soète et al. (1994). The low virulence strains that are more efficient in cyst formation in mice, such as the ME-49 strain, have a higher rate of cyst formation in culture than the high virulence strains, such as RH (Soète et al. 1994). This has been confirmed using cells that represent a major niche for cystogenesis *in vivo*, such as muscle tissue (Ferreira da Silva et al. 2009b).

After 14 days of infection, cysts with a well-preserved ultrastructure indicative of cell viability were observed in the supernatant of infected cultures. These results are in

accordance with Weiss et al. (1995), who detected free floating cyst-like structures released into the medium of tissue cultures within 3 days of infection. Thus, the CRFK line represent a potential cellular model for large scale cyst and bradyzoite production *in vitro*, which would allow a reduction in the number of animals used and/or replacement of animals by *in vitro* cultures.

The results of the novel use of epithelial cell lines in this study showed that they may contribute to our better understanding of the cell biology of *Toxoplasma*. The CRFK cell line has great potential as an alternative method to investigate the molecular aspects of *T. gondii*-feline cells interaction under controlled conditions. Altering the culture medium conditions by changing pH or using thermic shock may induce an increased rate of cystogenesis in these cultures. Because laboratory practices today require the adoption of the 3Rs (reuse, refinement and reduction) with regards to animals in research (Balls 2007), this approach could open a new field of research and gradually reduce the use of animals to obtain cysts and bradyzoites of *T. gondii*.

Acknowledgements. We are grateful to Sandra Maria de Oliveira Souza, Marielle Delfin Pereira and Genesio Lopes de Faria for their technical assistance and Dr. José Roberto Mineo from Immunoparasitology Laboratory, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil for providing anti-SAG-1 antibodies. This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Oswaldo Cruz (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde – PAPES VI), Pronex – Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – CNPq/FAPERJ and the Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

REFERENCES

- BALLS M. 2007: Animal experimentation and the Three Rs: the need for hard heads and soft hearts and to confront the Three "I"s. *Altern. Lab. Anim.* 35: 547–548.
- BLACK M.W., BOOTHROYD J.C. 2000: Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 607–623.
- CANTIN A., WOODS D.E. 1930: Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 91: 38–45.
- CRANDELL R.A., FABRICANT C.G., NELSON-REES W.A. 1973: Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro* 9: 176–185.
- DARDE M.L., BOUTEILLE B., LEBOUTET M.J., LOUBET A., PESTRE-ALEXANDRE M. 1989: *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64: 403–411.
- DUBEY J.P. 1973: Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of domiciled and stray cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162: 873–877.
- DUBEY J.P. 1998: Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1019–1024.
- DUBEY J.P. 2006: Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* 140: 69–75.
- DUBEY J.P., FRENKEL J.K. 1972: Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19: 155–177.
- DUBEY J.P., FRENKEL J.K. 1973: Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J. Parasitol.* 59: 505–512.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S., SPEER C.A. 1998: Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267–299.
- DUBEY J.P., NAVARRO I.T., SREEKUMAR C., DAHL E., FREIRE R.L., KAWABATA H.H., VIANNA M.C., KWOK O.C., SHEN S.K., THUL-LIEZ P., LEHMANN T. 2004: *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 90: 721–726.
- DZIERZYSINSKI F., NISHII, M., OUKO L., ROOS D.S. 2004: Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot. Cell* 3: 992–1003.
- FERGUSON D.J. 2004: Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.* 34: 347–360.

- de Mundo et al.: *T. gondii*-feline epithelial cells interaction
- FERGUSON D.J. 2009: *Toxoplasma gondii*: 1908–2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 133–148.
- FERGUSON D.J., HUTCHISON W.M., DUNACHIE J.F., SHIM J.C. 1974: Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol. 82: 167–181.
- FERGUSON D.J., HUTCHISON W.M., SHIM J.C. 1975: The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 5: 491–505.
- FERREIRA DA SILVA M.F., BARBOSA H.S., GROSS U., LÜDER C.G. 2008: Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biosyst. 4: 824–834.
- FERREIRA DA SILVA M.F., RODRIGUES R.M., ANDRADE, E.F., CARVALHO, L., GROSS U., LÜDER C.G., BARBOSA H.S. 2009a: Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 140: 196–200.
- FERREIRA DA SILVA M.F., TAKÁCS A.C., BARBOSA H.S., GROSS U., LÜDER C.G. 2009b: Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. Int. J. Med. Microbiol. 299: 281–288.
- FISCHER H.G., NITZGEN B., REICHMANN G., GROSS U., HADDING U. 1997: Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. Parasitol. Res. 83: 637–641.
- FLOOD P.P. 1975: Scanning electron microscope observations on the muscle innervation of *Oikopleura dioica* Fol (Appendicularia, Tunicata) with notes on the arrangement of connective tissue fibres. Cell Tissue Res. 164: 357–369.
- FREYRE A. 1995: Separation of *Toxoplasma* cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. J. Parasitol. 81: 1008–1010.
- GUIMARÃES E.V., ACQUARONE M., DE CARVALHO L., BARBOSA H.S. 2007: Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization. Micron 38: 651–658.
- GUIMARÃES E.V., DE CARVALHO L., BARBOSA H.S. 2008: Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. J. Parasitol. 94: 72–83.
- HOFF R.L., DUBEY J.P., BEHBEHANI A.M., FRENKEL J.K. 1977: *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. J. Parasitol. 63: 1121–1124.
- HOGAN M.J., YONEDA C., FEENEY L., ZWEIGART P., LEWIS A. 1960: Morphology and culture of *Toxoplasma*. Arch. Ophthalmol. 64: 655–667.
- JONES T.C., BIENZ K.A., ERB P. 1986: *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. Infect. Immun. 51: 147–156.
- LEHMANN T., BLACKSTON C.R., PARMLEY S.F., REMINGTON J.S., DUBEY J.P. 2000: Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. J. Parasitol. 86: 960–971.
- LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., DUBEY J.P., MASON W.H. 1991: Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from white-tailed deer in Alabama. J. Parasitol. 77: 62–64.
- MATSUBAYASHI H., AKAO S. 1963: Morphological studies on the development of the *Toxoplasma* cyst. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 321–333.
- McHUGH T.D., GBEWONYO A., JOHNSON J.D., HOLLIMAN R.E., BUTCHER P.D. 1993: Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. FEMS Microbiol. Lett. 114: 325–332.
- MOURA M.A., AMENDOEIRA M.R., BARBOSA H.S. 2009: Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 862–864.
- POPIEL I., GOLD M.C., BOOTH K.S. 1996: Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. J. Parasitol. 82: 330–332.
- SHIMADA K., O'CONNOR G.R., YONEDA C. 1974: Cyst formation by *Toxoplasma gondii* (RH strain) *in vitro*. The role of immunologic mechanisms. Arch. Ophthalmol. 92: 496–500.
- SOËTE M., CAMUS D., DUBREMETZ J.F. 1994: Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. Exp. Parasitol. 78: 361–370.
- SPEER C.A., DUBEY J.P. 2005: Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. Int. J. Parasitol. 35: 193–206.
- WEISS L.M., KIM K. 2000: The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Front. Biosci. 5: 391–405.
- WEISS L.M., LAPLACE D., TAKVORIAN P.M., TANOWITZ H.B., CALI A., WITTNER M.A. 1995: A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. J. Eukaryot. Microbiol. 42: 150–157.
- ZHANG Y.W., HALONEN S.K., MA Y.F., TANOWITZ H.B., WEISS L.M. 2010: A purification method for enrichment of the *Toxoplasma gondii* cyst wall. J. Neuroparasitol. 1: 1–6.
- ZHANG Y.W., HALONEN S.K., MA Y.F., WITTNER M., WEISS L.M. 2001: Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. Infect. Immun. 69: 501–507.

Received 16 July 2013

Accepted 11 November 2013

3.2. Interação Culturas Primárias de Células Epiteliais Intestinais de Felinos – *T. gondii*

Atendendo aos objetivos (1) “Avaliar a suscetibilidade de cultura primária de enterócitos de felinos (CEIF) à infecção por bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) com diferentes cargas infectivas; (2) “Caracterizar o destino intracelular de bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) em CEIF”; (3) “Caracterizar a CEIF morfológica e funcionalmente” e (4) “Estabelecer *in vitro* o ciclo enteroepitelial do *T. gondii*” foram gerados os seguintes resultados:

3.2.1. Materiais e métodos

3.2.1.1. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz (CEUA LW 50/14) e pelo Guia de Cuidados para o Uso de Animais para Fins Experimentais e Agentes Infecciosos (NACLAR).

3.2.1.2. Cultura Primária de Enterócitos de Felinos

Culturas primárias de células epiteliais intestinais de felinos (CEIF) foram obtidas de fetos de 3 gatas prenhes clinicamente saudáveis (sem patologias gastrintestinais e negativas sorologicamente para *T. gondii*, vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina). Amostras do intestino delgado correspondentes à região jejuno-ileal (~5 cm) foram coletadas assepticamente. As amostras foram removidas e mantidas em solução tampão salina fosfato estéril (PBS) a 4^o C com 10% de solução antibiótica (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA) durante o transporte até o laboratório. Os tecidos foram abertos longitudinalmente, lavados 3 vezes com PBS e mantidos nessa solução com 10% de solução antibiótica por 60 minutos a temperatura ambiente. Os tecidos foram divididos em fragmentos menores (1 cm³) e lavados em PBS. Os fragmentos foram, então, colocados em solução de dissociação não enzimática (pH 7.2) contendo 1 mM

EDTA (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA), 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA), 0.5 mM de dithiothreitol (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA) e 10% de solução antibiótica por 20 minutos sobre agitação a temperatura ambiente. (Perreault and Jean-Francois, 1996; Macartney et al., 2000; Aldhous et al., 2001; Rusu et al., 2005). Os agregados celulares foram plaqueadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/Hams F12 - Sigma-Aldrich), suplementado com 1% de solução antibiótica, 1 mM de glutamina, 5% de soro fetal bovino (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA) (Sanderson et al., 1996; Aldhous et al., 2001), 0,1% de insulina humana (Humulin N – Lilly, Indianapolis, IN, EUA), 100 nM de hidrocortisona (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA), 1% de aminoácidos não essenciais 100x (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), e 1 µg/ml de sal de sódio 3,3', 5-triiodo-L-thyronina (T₃) (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA) (Desmarests et al., 2013). As culturas foram mantidas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e a cada dois dias o meio de cultura era renovado.

3.2.1.3. *Estudos de Manutenção e Viabilidade celular*

Culturas de CEIF confluentes foram tratadas com solução de dissociação (PBS com 0.01% de EDTA e 0.25% de tripsina) a 37° C por 5 minutos. Após complete dissociação, foi adicionado meio de cultura a 4°C com 10% de soro fetal bovino para inibir a ação da tripsina. Após dissociação, à suspensão celular foi adicionada meio DMEM com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina e centrifugada durante 7 min a 650g a mesma temperatura. Procedeu-se então, a quantificação das células em câmara de Neubauer e o seu cultivo em placas de 24 poços sobre lamínulas (densidade celular de 1×10^5 células/poço) ou em placas de 35 mm² ($5,0 \times 10^5$ células/placa). As culturas foram fixadas em solução de Bouin e coradas em solução de Giemsa e analisadas diariamente sob microscopia de luz para avaliação da viabilidade, morfologia e proliferação com a utilização de microscópio optico Zeiss Imager A2. As imagens foram capturadas com auxílio de câmera colorida AxioncamMRc e software Axio Vision 40 v.4.8.2.0 da Zeiss.

3.2.1.4. *Imunofluorescência*

Alguns anticorpos monoclonais foram utilizados para realizar a caracterização da CEIF: anti-pan-citoqueratina clone PCK-26 (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, C1801), anti-vimentina clone VIM-13.2 (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, V5255), anti- fosfatase alcalina intestinal clone AP-59 (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, A9549) e anti-desmina clone DE-U-10 (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, D1033). As culturas foram fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em PBS durante 10 min a 25° C, lavadas 3 vezes em PBS e, então, incubadas em 50 mM cloreto de amônia por 30 min, para bloqueio dos radicais aldeídos livres. Após, as células foram permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) por 20 min. Para o ensaio de imunofluorescência indireta, as culturas foram incubadas por 2 h a 37°C com os seguintes anticorpos primários diluídos em PBS com 4% de BSA: anti-vimentina (1:200), anti-citoqueratina (1:100), anti- fosfatase alcalina intestinal e anti-desmina (1:100). Após as incubações, Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 4% BSA e reincubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário (IgG contra camundongo conjugado com FITC ou TRITC) na diluição de 1:100 (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA). Para revelar os filamentos de actina, as células foram incubadas por 1 h a 37°C com 4 µg/ml de Faloidina-FITC em PBS (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, EUA). Após a lavagem em PBS, as culturas foram incubadas por 10 min com 0.1 µg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol, Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em PBS, lavadas novamente em PBS e montadas em lâmina com DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2] octano-trietilenodiamina - "antifading", Sigma-Aldrich, em PBS contendo 50% de glicerol, pH 7.2). Os controles das reações foram realizados na ausência do anticorpo primário. As amostras foram analisadas com o microscópio de varredura confocal a laser (LSM 510 META/AxioVert, Zeiss, Alemanha) usando o laser 543 Hélio (LP560 filtro), laser 488 Argônio / Krypton (Ar/Kr) (filtro LP515) e o laser 405 Diiod (LP 420 filtro).

3.2.1.5. *Obtenção dos parasitos*

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 pesando entre 15-18g foram inoculados por via intraperitoneal com cerca de 50 cistos teciduais, previamente infectados com *T. gondii* da cepa avirulenta ME49 (cedida pelo Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil). Assim, 4-8 semanas pós-infecção, os cistos teciduais foram isolados e purificados do

cérebro dos camundongos para posterior utilização nos ensaios experimentais e para manutenção da cepa (Guimarães e cols., 2008). Em resumo, os cérebros dos camundongos foram isolados, lavados e homogeneizados em PBS, colocados em gradiente de 25% de Dextran, para purificação, objetivando separar os cistos dos debris celulares. Para obtenção de bradizoítos, os cistos foram incubados sob agitação por 1-5 min a 37°C, numa solução aquosa de pepsina ácida diluída na proporção 1:5 (pepsina ácida: cistos) visando o rompimento da parede cística. Para neutralização da atividade enzimática foi utilizada a solução de 1% carbonato de sódio. Os parasitos foram lavados 3 vezes, em meio DMEM/Hams F12, e a quantificação dos parasitos isolados foi determinada usando câmara de Neubauer, para utilização imediata nos experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira.

3.2.1.6. Interação entre *T.gondii* e células epiteliais intestinais de felinos (CEIF)

Culturas de CEIF confluentes foram infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49. Os ensaios de interação foram realizados na proporção de 1:5, 1:10 e 1:20 (parasito-célula hospedeira) durante períodos que variaram de 1 a 9 dias pós-infecção. Após lavagem em PBS, as amostras controles (não infectadas) e as infectadas foram fixadas e processadas de acordo com os ensaios a serem desenvolvidos. As culturas celulares após a interação parasito-célula hospedeira (24-96 h) foram fixadas em solução de Bouin por 5 min, lavadas com água destilada e coradas por 60 min em solução de 10% Giemsa diluída em PBS. Após a coloração, as lamínulas foram desidratadas em bateria decrescente/crescente de acetona-xilol e montadas em resina Permout (Fischer Scientific, Massachusetts - EUA). A análise quantitativa foi realizada a partir de três experimentos independentes, em duplicata, sendo quantificadas 400 células por lamínula. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e os resultados foram analisados estatisticamente com auxílio do teste Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando o p valor foi $< 0,05$.

3.2.1.7. Monitoramento dos estágios evolutivos de *T. gondii*

A diferenciação dos parasitos em culturas infectadas com bradizoítos, nas relações de 1:5 e 1:10 (parasito: célula hospedeira), foi monitorada com anticorpo estágio específico contra SAG1 (gentilmente cedido pelo Dr. José Roberto Mineo – Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil). Cistos de

T. gondii foram identificados com lectina DBA conjugada TRITC (Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, L6533), que se liga a grupos de N-acetyl-galactosamina (Zhang et al., 2001). Inicialmente, as células nos períodos de 1 a 4 dias de infecção foram fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em PBS por 10 min a 25°C, lavados 3 vezes em PBS. Após incubação em 50 mM cloreto de amônia por 30 min, para bloqueio dos radicais aldeídos livres, as células foram permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% BSA (Sigma-Aldrich) por 20 min. Para o ensaio de imunofluorescência indireta, as culturas foram incubadas por 2 h a 37°C com anticorpo primário contra SAG1 diluído 1:200 em PBS contendo 4% BSA. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 4% BSA e reincubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário (IgG contra camundongo conjugado com FITC- F5262). Para fluorescência direta, foi utilizada a lectina DBA-TRITC diluída 1:200 em PBS durante 1 h. Os controles das reações foram realizados na ausência do anticorpo primário e para a lectina DBA foi realizado um ensaio de competição com a adição de 50 mM de N-acetil-galactosamina (GalNAc). As amostras foram processadas e analisadas para microscopia de fluorescência como descrito anteriormente.

3.2.1.8. Análise Ultraestrutural

CEIF infectadas com *T. gondii* (ou não) foram fixadas por 1 h a 4°C com 2,5% glutaraldeído diluído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM cloreto de cálcio (pH 7.2). Após a fixação, as culturas foram lavadas e pós-fixadas numa solução de 1% de tetróxido de ósmio, por 1 h, no mesmo tampão e lavadas. Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células foram destacadas do substrato com auxílio de um raspador de células (“rubber policeman”) a 4°C e centrifugadas por 5 min a 10,000g. Posteriormente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina epoxi (Poly/Bed® 812 – Polysciences). Cortes ultrafinos foram recolhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo para análise ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011 da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz. Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), as CEIF foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas como descrito no item anterior. A secagem das amostras foi realizada pelo método do ponto crítico, sendo as lamínulas montadas com cola de prata em suportes de alumínio e revestidas com uma camada de ouro na espessura de 20 nm. As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV

com aceleração de voltagem de 15 kV da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz. Técnica de retirada da membrana da célula hospedeira com ajuda de fita adesiva, logo após secagem pelo ponto crítico, foi empregada, a fim de visualizar o interior das células com alta resolução pela MEV, o que possibilitou a análise do destino intracelular do parasito ao longo da interação *T. gondii*-célula hospedeira.

3.2.2. Resultados

3.2.2.1. Características morfológicas das células epiteliais de felinos *in vitro*

A adesão das células ao substrato foi observada após 24 horas de cultivo. Após 5 dias, as células apresentaram alinhamento e polarização, com os núcleos localizados no mesmo plano, semelhante ao observado em organizações colunares do tecido epithelial. (Fig. 1A). Análises ultraestruturais por MEV mostraram as características absorptivas destas células entre 24 – 96 horas de cultivo, com projeções de membrana citoplasmática estabelecendo pontos de adesão focal (Fig. 1B). Projeções longas e finas eram visíveis sobre a superfície da célula e, muitas vezes estabelecendo pontos de contatos célula-célula, bem como áreas extensas de contato, indicando a formação de áreas de membrana especializadas, como junções celulares (Fig. 1B). Análises por MET demonstraram que as células epiteliais mantiveram muitas características típicas do tecido epithelial intestinal, como a grande quantidade de microvilosidades, ou seja, borda em escova na região apical das células (1C-D). Espaços intercelulares contendo material eletrondenso e interdigitações laterais logo abaixo do complexo juncional foram observados entre duas células adjacentes (Fig. 1C). As áreas juncionais apresentaram junções do tipo “tight” (zônula ocludente), junções aderentes (zônula aderente) e desmosomos (Fig. 1D). Todas essas características confirmaram a natureza epithelial intestinal destas células em cultura. Os subcultivos da cultura primária de CEIF preservaram as as características morfológicas de células epiteliais. Após a primeira passagem, as células apresentaram monocamada homogênea com células alinhadas e polarizadas (dados não mostrados). As células multiplicaram-se e mantiveram a morfologia epithelial (com alinhamento dos núcleos), características que puderam ser visualizadas até a 6ª passagem.

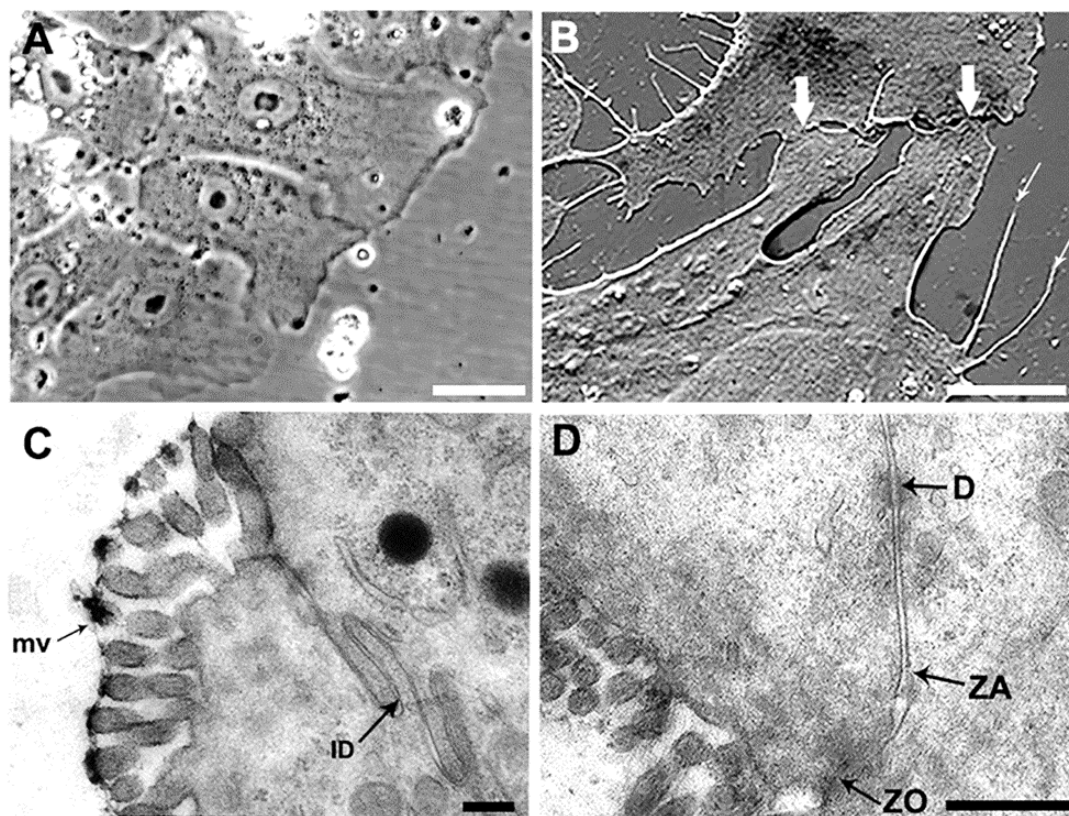


Figura 1: Características morfológicas de células isoladas do intestino delgado de felinos. (A) Células com 24 h de cultivo apresentaram características epiteliais, como alinhamento e polarização. Os núcleos das células localizaram-se no mesmo plano, semelhante à organização do epitélio intestinal. (B) Análises por MEV revelaram projeções citoplasmáticas longas e finas com pontos de adesão focal ao substrato (seta fina). Áreas de contato célula-célula mostraram semelhanças com áreas de junções intercelulares (seta grossa). (C-D) Grande número de microvilosidades (Mv) foram observadas na região apical da célula, bem como áreas de do complex junctional (ZO = zônula ocludente; ZA = zônula aderente; D = desmossomos) por MET. Interdigitações laterais (ID) foram visualizadas abaixo do complex junctional. Barras: (A) 20 μm ; (B) 5 μm ; (C) 0.5 μm ; (D) 0.2 μm

3.2.2.2. *Expressão de marcadores epiteliais intestinais em CEIF*

Para confirmar a natureza epitelial da CEIF, foi utilizado anticorpo contra citoqueratinas que reconhece uma gama de citoqueratinas (1, 5, 6, 8 e 10) que constituem os filamentos intermediários de células epiteliais (Fig. 2Ab-g). As propriedades funcionais foram avaliadas com base na expressão da enzima fosfatase alcalina intestinal (Fig. 2B-D). A microscopia de varredura confocal a laser mostrou que subcultivos da CEIF preservaram características morfológicas e funcionais de enterócitos imaturos. As células mantiveram forte expressão para citoqueratina concentrada ao redor do núcleo até duas semanas de cultivo (Fig. 2Ae-g). A marcação para filamentos de actina nas mesmas culturas, através da Faloidina conjugada a FITC, mostrou que houve pouca ou nenhuma co-localização entre as duas proteínas de citoesqueleto (Fig. 2A). Os filamentos de actina foram observados principalmente em áreas da membrana com pontos de adesão focal ao substrato (Fig. 2Ae-g). A expressão de fosfatase alcalina intestinal foi inicialmente observada após 5 dias de cultivo (Fig. 2B). A expressão da enzima mostrou aumento progressivo ao longo da cultura, concentrando-se próximo ao núcleo, principalmente entre 7-9 dias de cultivo (Fig. 2C-D). As análises da expressão de vimentina e desmina não mostraram marcação positiva ao longo de 15 dias de cultivo (dados não mostrado), como esperado para células epiteliais intestinais.

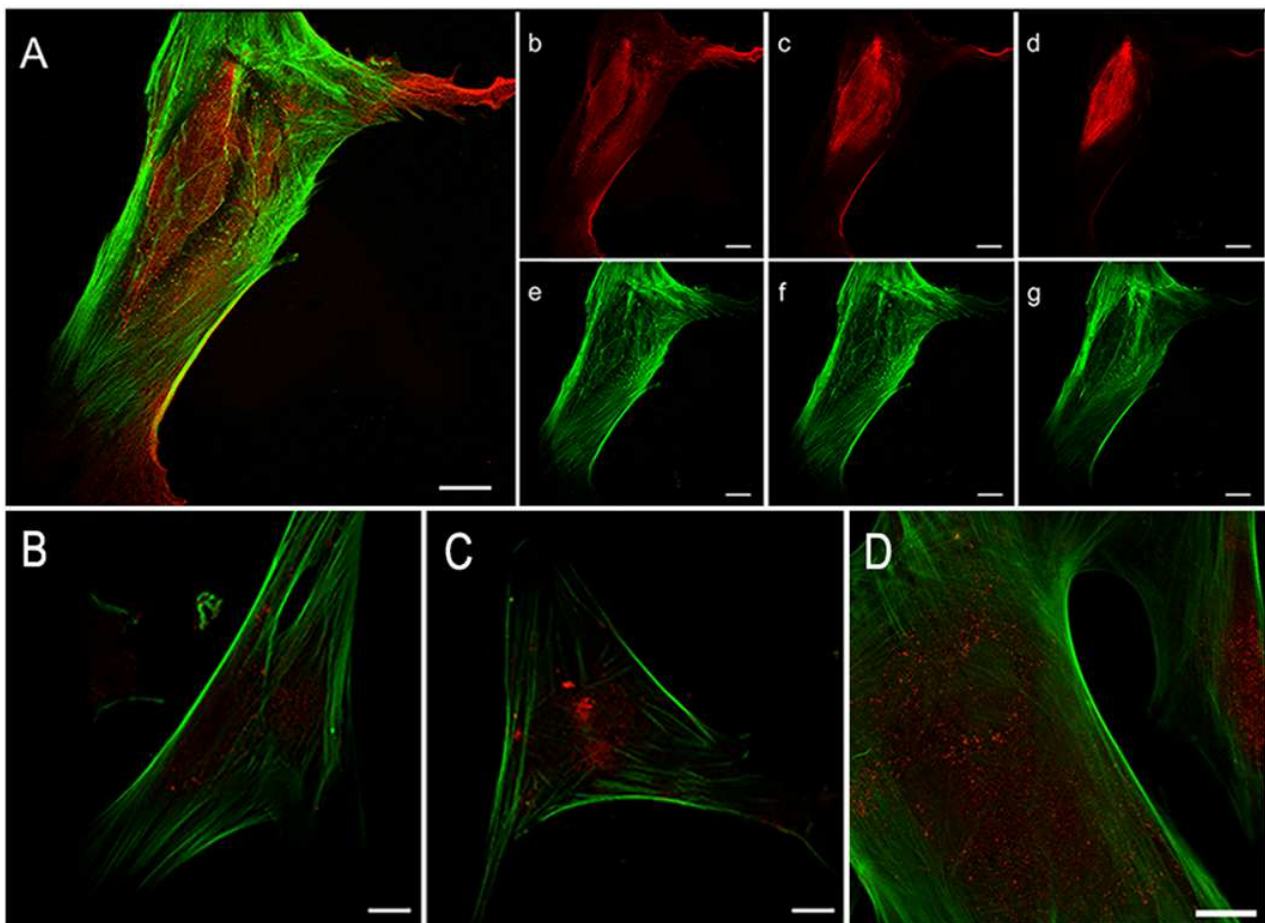


Figura 2: Expressão de citoqueratina e fosfatase alcalina intestinal. (A) Culturas secundárias de CEIF com morfologia epitelial revelada pela dupla marcação: citoqueratina-TRITC em vermelho e filamentos de actina em verde. (Ab-d) A Expressão de citoqueratina foi observada ao redor do núcleo (Ae-g) A organização dos filamentos de actina revelados pela faloidina mostrou a morfologia da CEIF e a concentração desta proteína nos pontos de adesão focal. (B-D) A reação positiva para fosfatase alcalina intestinal na CEIF demonstrou aumento progressivo da Expressão desta enzima ao longo do cultivo celular (5-9 dias). (B) 5 dias; (C) 7 dias e (D) 9 dias pós-cultivo. Barras: 20 μ m.

3.2.2.3. Interação bradizoítos de *T. gondii*-CEIF *in vitro*

Moura e cols. (2009) descreveram o comportamento de bradizoítos durante a interação com CEIF. Na presente tese, análises quantitativas e qualitativas foram realizadas com cargas infectivas de 1:5, 1:10 e 1:20 (parasite: célula hospedeira). O número de células infectadas foi analisado entre 24 a 96 horas de interação entre o parasite e a célula hospedeira, como demonstrado na Figura 3. Os dados mostraram a influência da carga parasitária no número de enterócitos infectados ao longo do tempo estudado, com 7,3% de células infectadas após 24 h de interação e 42,4% de células infectadas após 96 h quando a carga de 1:5 foi utilizada. As cargas de 1:10 e 1:20 resultaram em menor quantidade de enterócitos infectados, como esperado. As diferenças foram significativas ($p < 0,05$), principalmente quando a carga de 1:5 foi comparada com 1:10 e 1:20. A principal diferença entre as cargas 1:10 e 1:20 foi a ocorrência de estruturas semelhantes a cistos (cisto-like) ou esquizontes (esquizonte-like). As estruturas cisto-like ocorreram com maior frequência quando a carga de 1:10 foi utilizada, já a carga de 1:20 apresentou estruturas esquizontes-like após 48 h de infecção (Tabela 1).

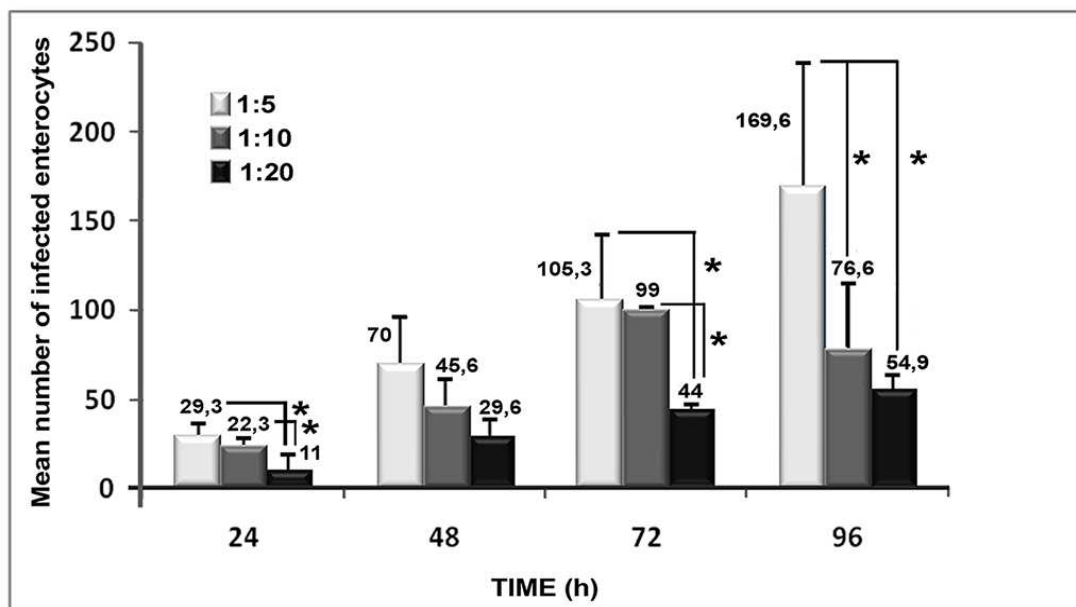


Figura 3: Número médio de CEIF infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME-49 usando cargas infectivas de 1:5, 1:10 e 1:20 (parasito-célula hospedeira). * $p < 0.05$

Table 1: Análise quantitativa de formas cisto-like e esquizonte-like durante o curso de infecção de CEIF por bradizoítos *T. gondii* da cepa ME49.

Horas de interação	Relação Parasito: célula hospedeira	Células infectadas (%)	Cisto-like (%)	Esquizonte-like (%)
24h	1:5	7.3 ^a	0 ^a	0 ^a
	1:10	5.6 ^a	0 ^a	0 ^a
	1:20	2.8 ^a	0 ^a	0 ^a
48h	1:5	17.5 ^a	0.9 ^a	0 ^a
	1:10	11.4 ^a	9.5 ^a	0.7 ^a
	1:20	7.4 ^a	12.0 ^a	5.6 ^{a*}
72h	1:5	26.3 ^{a*}	2.8 ^a	0 ^a
	1:10	24.8 ^a	32.3 ^{a*}	0.7 ^a
	1:20	11.0 ^a	24.1 ^a	13.4 ^{a*}
96h	1:5	42.4 ^{*a}	0.78 ^a	0 ^a
	1:10	19.2 ^a	52.6 ^{a*}	0 ^a
	1:20	13.7 ^a	15.7 ^a	7.9 ^{a*}

^aMédia ± Desv Pad de pelo menos três experimentos independentes.

*Asterísticos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes relações parasito: célula hospedeira sob as mesmas condições.

As análises da interação parasito-CEIF com a carga infectiva de 1:5 mostrou parasitos em duplas durante as primeiras 24 horas de interação, sugerindo que nesse período a replicação ocorreu por endodiogenia (Fig. 4A). Culturas infectados por 48 horas mostraram vacúolos parasitóforos com parasitos em rosetas, caracterizando o processo de divisão celular realizada por taquizoítos (Fig. 4B) sugerindo a conversão de bradizoítos em taquizoítos (Fig. 4C). Após 96 horas de interação, os parasitos foram observados no meio extracelular, caracterizando o ciclo lítico do *T. gondii*, com proliferação de taquizoítos, confirmados pela maracção positiva para SAG 1 (Fig. 4D-E).

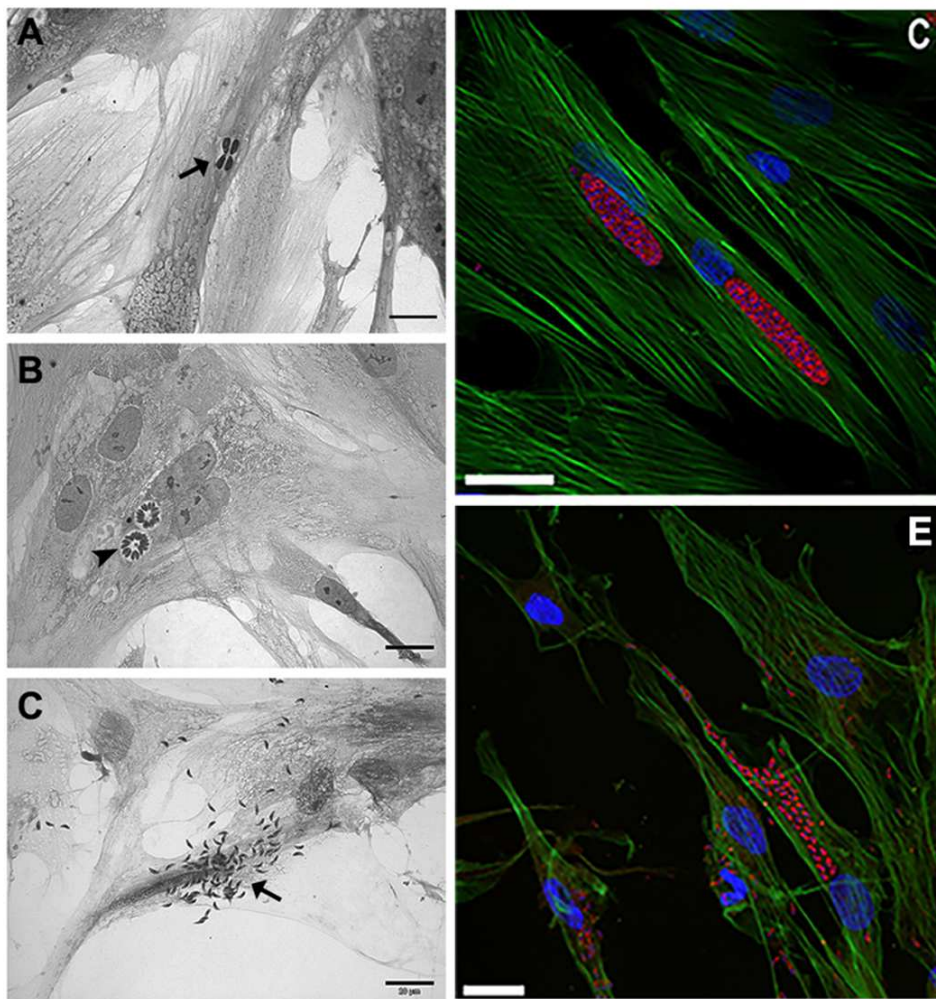


Figura 4: Enterócitos de felinos infectados com bradizoítos de *T. gondii* (1:5 parasito:célula hospedeira). (A) Parasitos em duplas após 24 h de infecção indicando replicação por endodiogenia (seta). (B, C) Vacúolos parasitóforos mostraram parasitos em rosetas clássicas, indicando interconversão de bradizoítos para taquizoítos (cabeça de seta) como observado por imunomarcacção para SAG1 (vermelho) e filamentos de actina (verde). (D, E) O estabelecimento do ciclo lítico foi observado com 96 h (seta) realizado por proliferação de taquizoítos (vermelho). Barras: 20 μ m.

O estabelecimento da cistogênese do *T. gondii* foi confirmado com a carga de 1:10, como mostrado na figura 5. Estruturas intracelulares “cisto-like” foram observadas nos enterócitos após 72 h de interação, por microscopia de contraste de fase (Fig. 5A) e coloração de Giemsa (Fig. 5B). Análises por citoquímica, com a utilização da lectina DBA (reconhece parede cística) conjugada a TRITC, resultou em reações positivas com 72 h, confirmando o estabelecimento da cistogênese *in vitro* (Fig. 5C). Além disso, enterócitos infectados e incubados simultaneamente com anticorpo contra-SAG1, sob as mesmas condições experimentais, mostraram que estágios taquizoítos estavam presentes no interior de alguns destes cistos, caracterizando-os como cistos mistos. Este resultado foi também observado em cortes seriados obtidos por microscopia confocal (Fig. 5Ca-f) e por análise ultraestrutural (Fig. 5D-E).

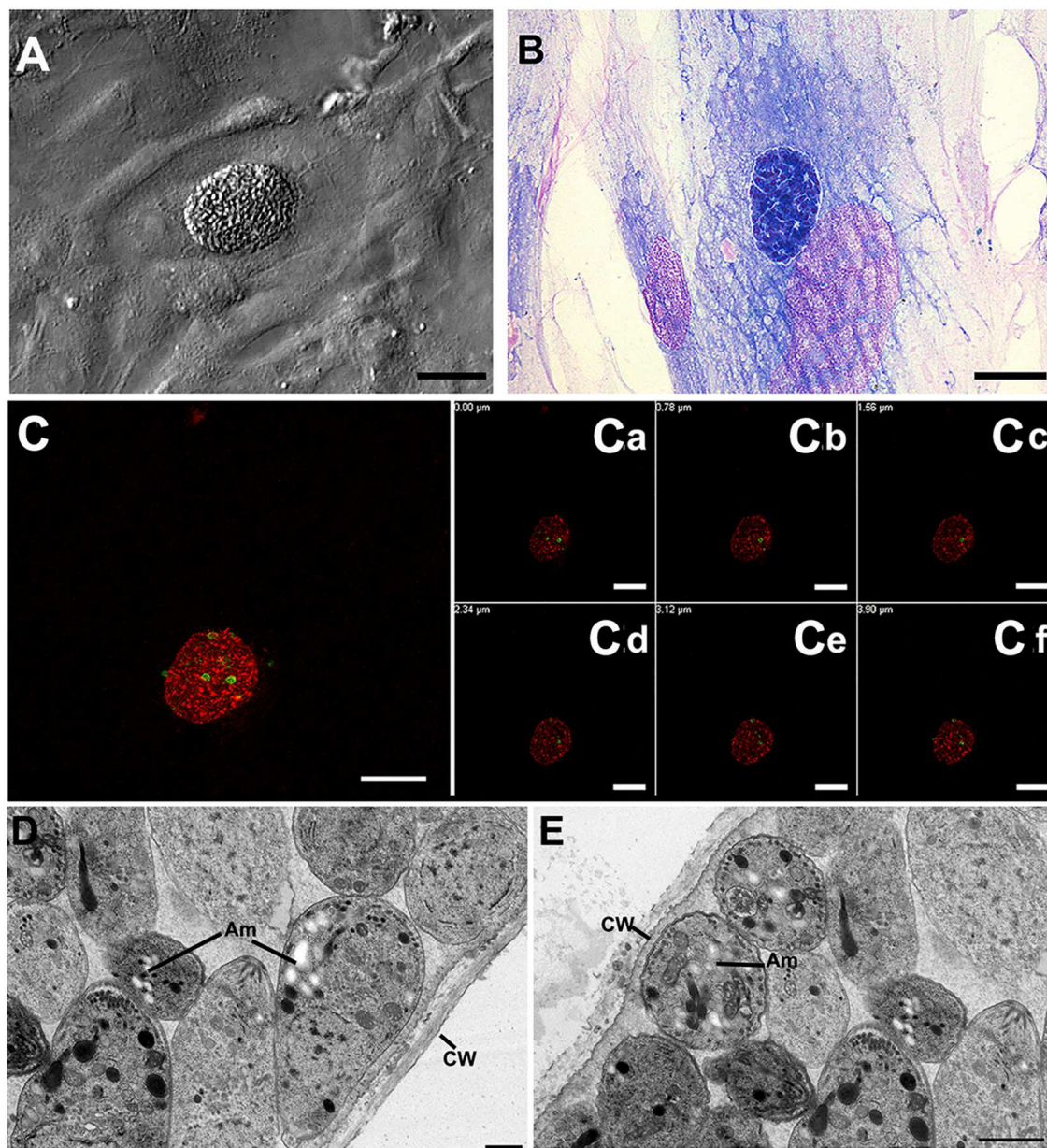


Figura 5: Cistos de *T. gondii* em CEIF infectada com carga de 1:10 (parasite: célula hospedeira). (A-B) Contraste de interferência diferencial (DIC) e coloração de Giemsa mostraram estruturas semelhantes a cistos com 72 h de infecção. (C) Confirmação da cistogênese *in vitro* pela incubação com a lectina BDA-TRITC (vermelho). (Ca-f) Cortes seriados obtidos por microscopia de varredura confocal a laser mostrando a presença de alguns taquizoítos (verde) no interior do cisto. (D-E) Cistos de *Toxoplasma gondii* revelados por MET com a presença de parede cística (CW) by TEM with the cyst wall (CW) e parasitos contendo grânulos de amilopectina (Am), caracterizando os bradizoítos. Barras: (A-D) 20 μ m, (D) 0.5 μ m, (E) 1 μ m.

Como já descrito durante as análises quantitativas, formas esquizontes de *T. gondii* foram observadas em CEIF, quando a carga infectiva de 1:20 foi utilizada (Tabela 1). Inicialmente, com 48 h de interação, as culturas coradas com Giemsa mostraram grandes vacúolos parasitóforos (VP) contendo diversos parasitos que formavam uma grande massa multinucleada (Fig. 6 A-E). Foi possível comparar essas estruturas com as previamente descritas em sistemas *in vivo* durante a infecção de gatos e que foram caracterizadas como formas de esquizontes do tipo B (Fig. 6 A-E). Sob as mesmas condições, parasitos intracelulares foram observados em arranjos periféricos no interior do VP após 72 h de infecção, semelhante a morfologia dos esquizontes do tipo C, também descritos previamente em intestinos de felinos (Fig. 7A-D).

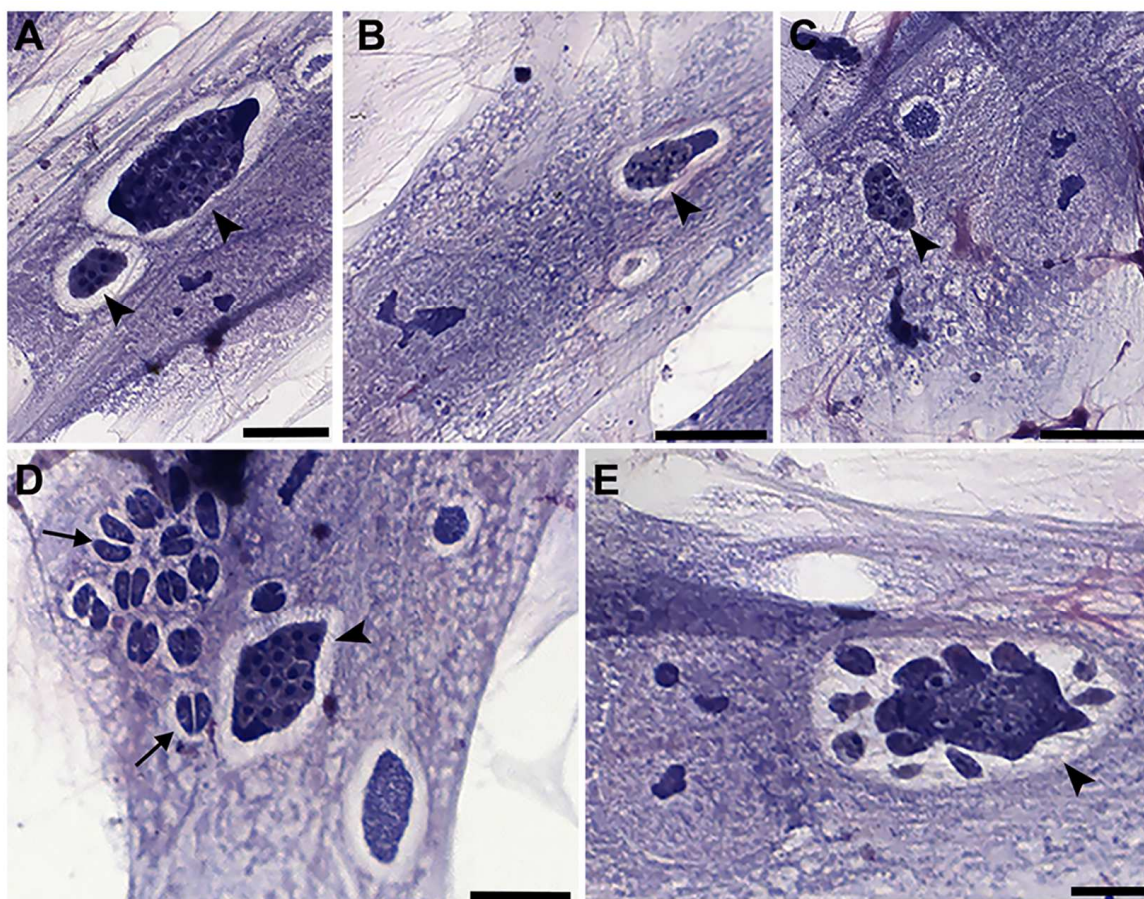


Figura 6: Estruturas esquizontes-like de *T. gondii* cepa ME49 após 48 h de infecção. (A-E) CEIF infectadas mostraram grandes vacúolos parasitóforos contendo diversos parasitos em uma grande massa multinucleada que se assemelharam aos esquizontes do tipo B (cabeças de seta). (D) Algumas células mostraram vacúolos com parasitos em duplas como produto de divisões celulares por endodiogenia (setas) adjacentes às massas multinucleadas (cabeça de seta). Barras: 10 μ m.

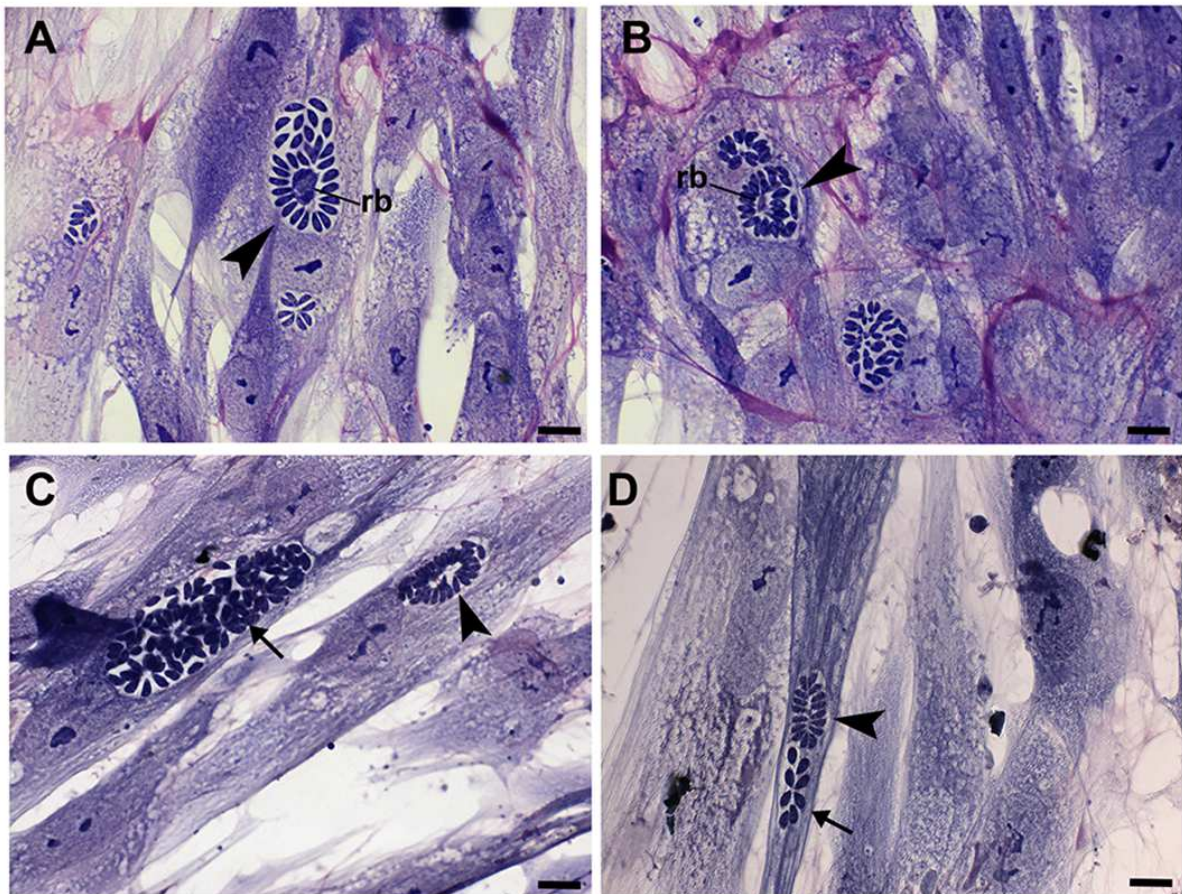


Figura 7: Estruturas esquizontes-like de *T. gondii* cepa ME49 após 72 h de infecção. (A-D) Vacúolos parasitóforos morfologicamente menores e parasitos com arranjo periférico no interior desses VP com ou sem a presença de um grande corpo residual (rb) como descrito para esquizontes do tipo C (cabeças de seta). Outros VP com parasitos em diferentes estágios de desenvolvimento puderam ser observados em células vizinhas ou dentro de uma única célula (setas). Barras: 10 μ m.

O tipo de esquizonte tipo C se mostrou distinto de rosetas de taquizoítos observadas durante o ciclo lítico do *T. gondii*. Este resultado foi confirmado por MET, onde culturas infectadas de CEIF mostraram VP com parasitos de morfologia muito semelhante aos estágios enteroepiteliais de *T. gondii* encontrados em felinos. As micrografias eletrônicas mostraram células com pelo menos 3 VP contendo parasitos multinucleados (Fig. 8A) semelhantes aos observados previamente pela coloração de Giemsa (Fig. 6A-E). Esses estágios de *T. gondii* apresentaram grande quantidade de grânulos densos, grandes corpúsculos lipídicos e numerosas e pequenas mitocôndrias, além da presença de uma rede de membranas tubulovesiculares bem desenvolvida no interior do VP (Fig. 8 A-E). Imagens em maiores aumentos mostraram parasitos muito semelhantes aos esquizontes do tipo D com alguns merozoítos emergindo de um grande corpo residual (Fig. 8 B-E). Foi possível encontrar parasitos com as mesmas características em outras células da mesma cultura (merozoítos do tipo D e parasitos entre os estágio C e D) (Fig.8 F-H).

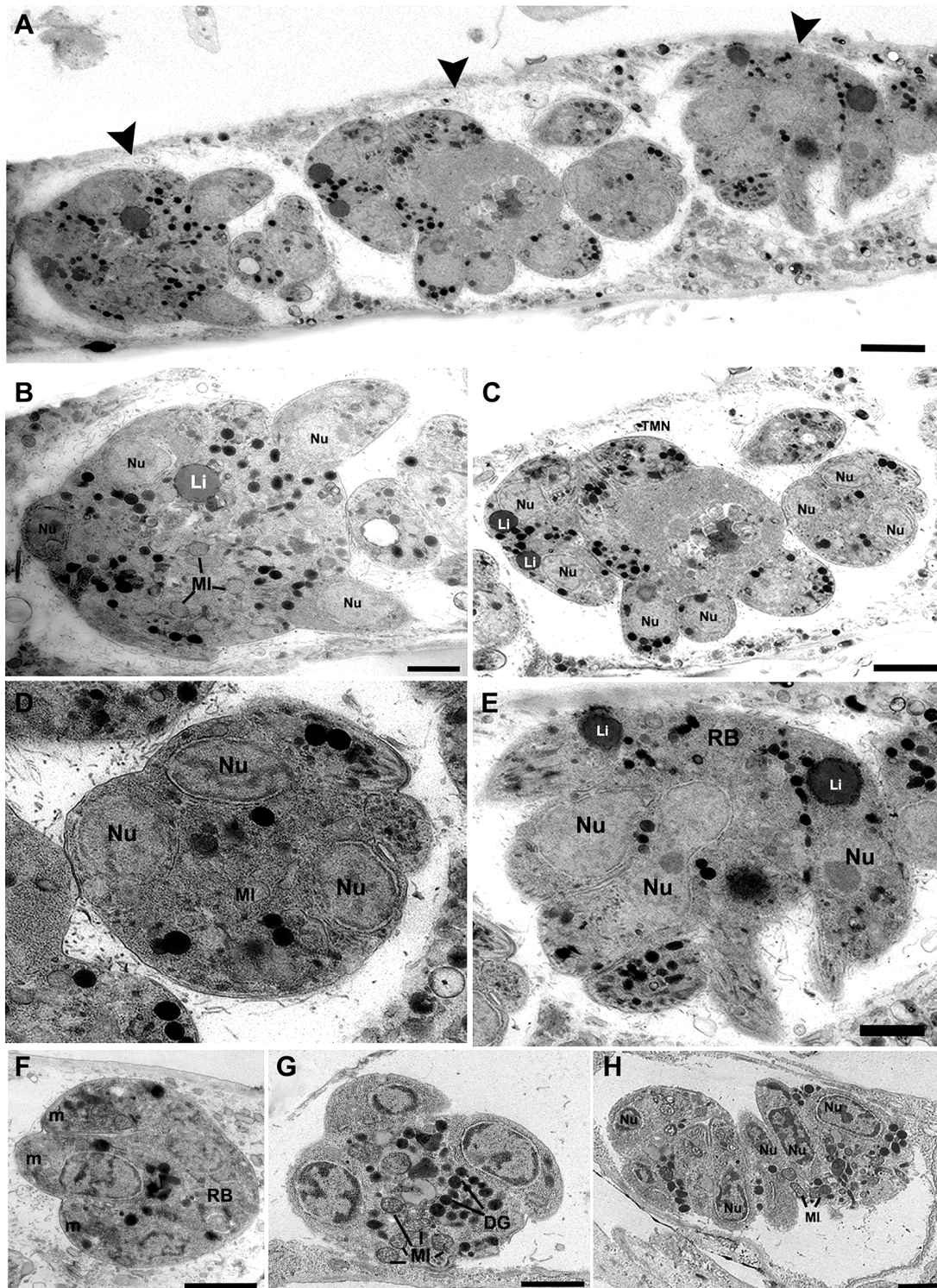
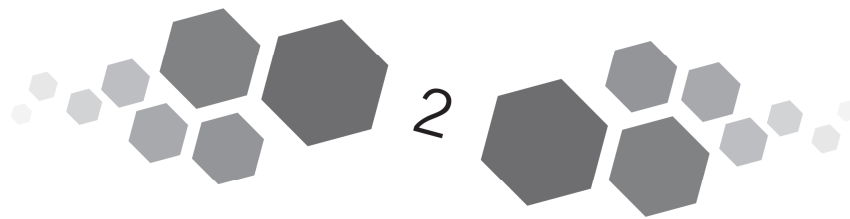


Figura 8: Esquizontes de *T.gondii* in vitro após 9 dias de infecção. (A) Um único enterócito com pelo menos 3 VP contendo parasitos multinucleados com características de esquizontes. (B-E) Maiores aumentos mostram parasitos muito semelhantes aos esquizontes do tipo D, com alguns merozoítos (m) emergindo de um corpo residual (RB). Estas formas de *T. gondii* apresentaram grande quantidade de grânulos densos (DG), grandes corpúsculos lipídicos (Li) e numerosas e pequenas mitocôndrias (MI). A matriz do vacúolo mostrou a presença de uma rede de membranas bem desenvolvida. (F-H) Diversas células infectadas após 10 dias revelaram esquizontes em diferentes estágios de replicação por endopoligenia com merozoítos (m) formados semelhantes aos tipos C e D. Barras: (A) 2 μ m; (B-H) 1 μ m.

3.3. Capítulo de Livro

O capítulo “O Ciclo Evolutivo” da obra *Toxoplasmose e Toxoplasma gondii* foi resultado do desenvolvimento do objetivo nº 4 “Estabelecer *in vitro* o ciclo enteroepitelial do *T. gondii*”.



O Ciclo Evolutivo

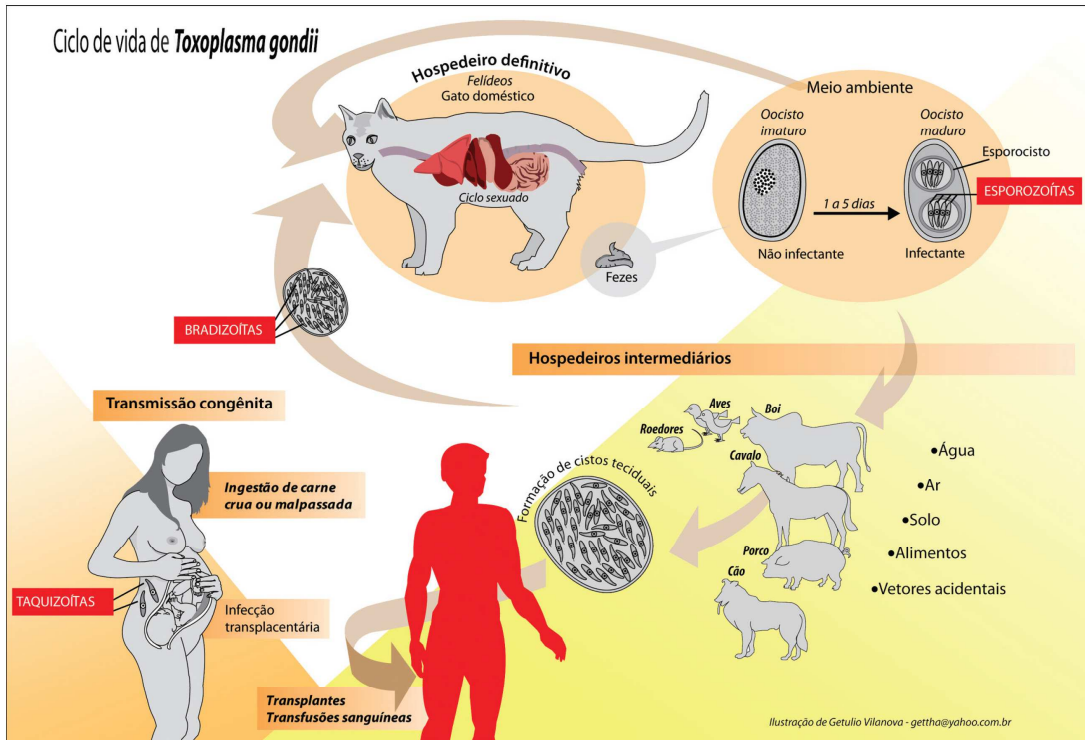
Helene Santos Barbosa • Renata Morley de Muno • Marcos de Assis Moura

BREVE HISTÓRICO

Embora a identificação do *Toxoplasma gondii* tenha ocorrido em 1908, sua transmissão permaneceu um mistério durante trinta anos. Em 1939 houve a primeira evidência da transmissão congênita. Ainda assim, o ciclo evolutivo, a explicação de sua ampla distribuição geográfica e as vias de transmissão permaneceram na obscuridade até 1970. A evidência de que o toxoplasma é um parasita intracelular obrigatório, por exemplo, só foi demonstrada experimentalmente em 1937 por Sabin e Olitsky. Na década de 1950, uma das principais questões entre os cientistas era explicar como tantos animais e seres humanos se infectavam com *T. gondii*. Inúmeras foram as tentativas de demonstrar o envolvimento de artrópodes nessa transmissão, devido à presença do parasita no sangue dos hospedeiros, sem sucesso. O conhecimento dos estágios infecciosos, de taquizoítas e de cistos teciduais levou à hipótese de que o carnivorismo pudesse ser um mecanismo de infecção (Weinman & Chandler, 1954). A demonstração, em 1960, por Jacob e colaboradores, da resistência de bradizoítas derivados de cistos teciduais (presentes em carne crua ou malcozida) às enzimas proteolíticas permitiu a Desmonts, Couvreur e Ben Rachid (1965) testarem esta hipótese, confirmando que esta era uma das vias de transmissão do parasita. Esses dados conflitavam com a alta incidência de infecção entre os herbívoros e vegetarianos. Esse quadro de dúvida foi elucidado por Hutchison (1965), que identificou o oocisto como a forma resistente do parasita. Assim, nos anos 1970 o ciclo de vida do toxoplasma foi desvendado quase simultaneamente por vários grupos (revisto em Dubey, 2008; 2009; Ferguson, 2009): o estágio oocisto presente nas fezes de gatos era derivado do desenvolvimento sexual do parasita no intestino dos felinos. Esse conhecimento permitiu a incorporação do gato ao ciclo evolutivo do toxoplasma, como seu hospedeiro definitivo, e animais de sangue quente, como hospedeiros intermediários. Assim, as vias de transmissão do parasita foram estabelecidas por duas rotas principais: congênita e infecção oral por diferentes estágios infecciosos – cistos teciduais por carnivorismo, pela ingestão de carne crua ou malpassada e pela ingestão de oocistos presentes em alimentos, no solo ou na água, o que justifica a sua alta incidência entre os vegetarianos e herbívoros (revisto em Jones e Dubey, 2010). Na Figura 1, representa-se o ciclo de transmissão do toxoplasma.

Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

Figura 1 – Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos



Fonte: Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009.

FORMAS INFECTANTES

As formas evolutivas do *T. gondii* responsáveis pela infecção dos hospedeiros intermediários e definitivos são: cistos teciduais (contendo bradizoítas) presentes em carnes e vísceras de organismos infectados; taquizoítas encontrados em diversos tecidos e fluidos corporais e os esporozoítas encontrados no interior de oocistos eliminados pelas fezes dos hospedeiros definitivos (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Dubey, 2002). Existem, entretanto, diferenças quanto à infectividade de cada uma dessas formas de acordo com o hospedeiro. Das três formas infectantes, o cisto tecidual, contendo os bradizoítas, parece ser a forma mais efetiva para infecção de felídeos, resultando, após a ingestão, na liberação de oocistos nas fezes de quase todos os animais testados. Em contrapartida, oocistos e taquizoítas, quando ingeridos por felídeos, levam à produção de oocistos em menos de 30% dos animais infectados (Ferguson, 2009). A formação de oocistos parece ser uma etapa natural do ciclo de vida do *T. gondii* em felídeos, não estando relacionada ao estado imunológico do hospedeiro (Dubey, 2009).

Taquizoítas

O termo 'taquizoíta' (*taqui-* = 'rápido' em grego) foi criado por Frenkel (1973) para descrever o estágio evolutivo do parasita, que se multiplica rapidamente dentro de muitos tipos celulares do hospedeiro intermediário e nas células epiteliais não intestinais do hospedeiro definitivo. Taquizoítas também têm sido chamados de trofozoítas, endodiozoítas ou endozoítas, que são termos mais antigos (revisto em Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Os taquizoítas

possuem formato elíptico (4-8 μm x 2-4 μm) e são obrigatoriamente intracelulares de todas as células nucleadas. Invadem as células preferencialmente por penetração ativa, são encontrados no interior de vacúolos parasitóforos e, eventualmente, são intranucleares (Dubey, 2002; Barbosa *et al.*, 2005; Jones & Dubey, 2010). A multiplicação dos parasitas intravacuolares ocorre por endodiogenia, que é a forma especializada de multiplicação assexuada, onde duas células-filhas se formam no interior da célula-mãe (De Souza, 1974). Cessada a replicação, os taquizoítas completam seu ciclo lítico: deixam o vacúolo e alcançam o meio extracelular pelo rompimento da membrana plasmática da célula hospedeira, disseminando-se pela via hematogênica ou linfática para vários tecidos (Dubey, 1998). Os taquizoítas são o estágio responsável pela fase aguda da infecção. As características ultraestruturais das formas evolutivas serão tratadas no Capítulo 3.

Cistos Teciduais

Depois de um número desconhecido de divisões e mecanismos ainda não bem esclarecidos, os taquizoítas de *T. gondii* do interior das células dão origem a outro estágio evolutivo denominado bradizoíta. Essa forma infecciosa tem como principal característica biológica a capacidade de se reproduzir lentamente (*bradi-* = lento, em grego). O termo foi criado por Frenkel (1973) e é também conhecido como cistozoíta (revisto em Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Os bradizoítas medem aproximadamente 7 μm x 1,5 μm (Weiss & Kim, 2000). Os eventos que se seguem após a diferenciação dos bradizoítas são as alterações morfológicas da membrana e da matriz do vacúolo parasitóforo, constituindo a parede cística e dando origem ao cisto tecidual, estrutura característica da fase crônica da infecção (Weiss & Kim, 2000; Guimarães *et al.*, 2007). Cistos teciduais variam de tamanho: os jovens podem medir cerca de 5 μm de diâmetro e conter somente dois parasitas, enquanto os mais velhos podem conter centenas de organismos, alcançando em média 60 μm de diâmetro. Embora os cistos teciduais se desenvolvam em diversos órgãos como pulmões, fígado e rins, eles são prevalentes nos tecidos muscular e nervoso, incluindo o cérebro, olhos e músculos esquelético e cardíaco (Speer, Clark & Dubey, 1998; Weiss & Kim, 2000; Jones & Dubey, 2010). Cistos teciduais no cérebro são frequentemente esféricos e raramente alcançam 70 μm de diâmetro, enquanto cistos intramusculares são alongados e podem atingir 100 μm de tamanho (Dubey, 1998).

Os cistos teciduais podem permanecer latentes por toda a vida do hospedeiro sem causar uma resposta inflamatória ou imunológica, evitando, assim, sua destruição (Hill & Dubey, 2002). Durante o curso da infecção, os cistos teciduais podem romper-se, e com a diferenciação de bradizoítas em taquizoítas (conversão), reinvasam outras células hospedeiras e se rediferenciam em bradizoítas (interconversão), formando um novo cisto tecidual (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

A parede dos cistos teciduais é rica em açúcares e outros polissacarídeos, elástica e pouco densa (< 0,5 μm de espessura), e é constituída por uma membrana e pela região granular (localizada na face interna dessa membrana). A região granular é formada por um material elétron-denso granuloso que também preenche os espaços entre os bradizoítas (Weiss & Kim, 2000; Guimarães, Carvalho & Barbosa, 2003; Guimarães *et al.*, 2007). É bem aceito na literatura que a parede cística tenha sua origem molecular na célula hospedeira e/ou no produto de secreção do parasita intravacuolar. A parede cística e a matriz cística provavelmente promovem uma barreira física contra o sistema imune do hospedeiro (Weiss & Kim, 2000).

Em alguns estudos, demonstra-se a existência de tropismo maior para formação de cistos cerebrais em pequenos roedores, independentemente da cepa de *T. gondii*, enquanto para grandes mamíferos como bovinos, ovinos e caprinos os cistos são predominantemente musculares (Dubey & Jones, 2008).

Oocistos

Oocistos contêm formas infectantes de *T. gondii* e são produzidos no epitélio intestinal dos felídeos (hospedeiros definitivos) e eliminados, ainda imaturos, junto com as fezes no meio ambiente, onde sofrem maturação (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000). Esse processo de maturação ou esporulação, que ocorre fora do corpo do hospedeiro, pode durar de um a 21 dias, sob a influência da oxigenação, umidade e temperatura adequadas (Hill & Dubey, 2002; Dubey, 2004). Os oocistos não esporulados têm forma ovalada e dupla membrana. Os oocistos esporulados são elípticos, contêm dois esporocistos e cada esporocisto possui quatro esporozoítas. Os esporozoítas medem cerca de 6-8 μm x 2 μm . Morfologicamente, representam a forma intermediária entre taquizoítas e bradizoítas, considerada a quantidade de determinadas organelas: número intermediário de micronemas, um número superior de grânulos densos em relação aos taquizoítas e muitos grânulos de amilopectina como os bradizoítas. Caracterizam-se pela presença de muitos grânulos lipídicos, que parecem ser uma exclusividade dos esporozoítas (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Speer, Clark & Dubey, 1998; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005).

A formação de oocistos ocorre mediante reprodução sexuada ou ciclo enteroepitelial exclusivo de gatos domésticos e outros felídeos, nos quais se observam (no epitélio intestinal, mais precisamente na região jejunoileal do intestino delgado) os processos de esquizogonia, gametogonia e esporogonia (Hill & Dubey, 2002; Ferguson, 2009; Jones & Dubey, 2010).

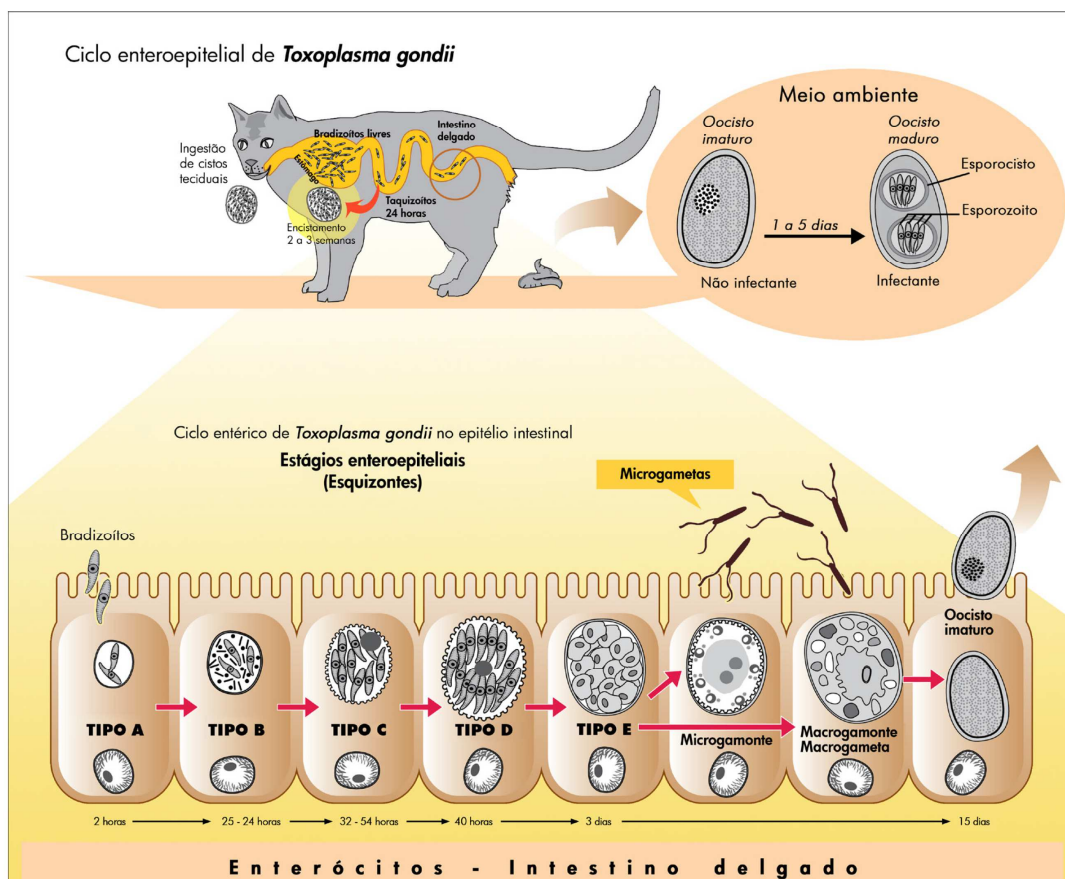
O ciclo sexuado de *T. gondii* pode-se iniciar por qualquer forma infectante do parasita: bradizoítas dos cistos presentes em carnes, taquizoítas em diversos tecidos e fluidos corporais e esporozoítas em oocistos esporulados (Dubey, 2004; Jones & Dubey, 2010). O tempo de pré-patência e a frequência da liberação de oocistos dependem da forma infectante ingerida: de três a dez dias após ingerir cistos teciduais ou bradizoítas, maior ou igual a 13 dias após a ingestão de taquizoítas e de 18 ou mais dias após ingestão de oocistos (Dubey, 2004; Dubey & Jones, 2008). Após a ingestão dos cistos teciduais pelos gatos, a parede cística é destruída por enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado. Os bradizoítas são liberados e penetram na parede intestinal, iniciando o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii*. Ocorrem cinco estágios enteroepiteliais, ou esquizontes distintos, tipos A, B, C, D e E (Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005; Dubey, 2009; Ferguson, 2009).

Os esquizontes se localizam entre a superfície interna e o núcleo dos enterócitos (Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). Os estágios enteroepiteliais ocorrem de maneira sequencial e são morfológicamente semelhantes aos demais tipos infecciosos de *T. gondii* (Dubey & Frenkel, 1972) como representados na Figura 2. A diferenciação mais acentuada fica restrita à estrutura do vacúolo parasitóforo (VP) que, neste caso, é repleto de uma rede de membranas tubulovesiculares (RMTV) (Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). O ciclo enteroepitelial se inicia pelo esquizonte do tipo A, que é observado nos enterócitos superficiais e às vezes na lâmina própria intestinal dos gatos, após 12 a 18 horas da ingestão de cistos. Possui núcleo centralizado, pode ser corado pelo Giemsa e é negativo para o ácido periódico de Schiff (PAS). O esquizonte do tipo B ocorre de 12 a 54 horas pós-infecção e se multiplica por endodigenia, enquanto os demais se multiplicam por endopoligenia (forma especializada de multiplicações assexuadas em que várias células-filhas se formam no interior da célula-mãe) (De Souza, 1974). Apresenta núcleo centralizado e alguns grânulos situados na periferia citoplasmática são positivos para PAS. A divisão destes organismos é pleomórfica, existindo organismos com três ou mais núcleos (Dubey & Frenkel, 1972). No interior de enterócitos, localizam-se em um grande vacúolo parasitóforo, cuja matriz é rica em RMTV (Dubey & Frenkel, 1972). Esquizontes multiplicam-se exclusivamente por endodigenia e ultraestruturalmente são muito similares aos taquizoítas, porém ocorrem exclusivamente em enterócitos felinos, medindo 5,8 μm x 2,9 μm . Possuem poucos e pequenos grânulos de amilopectina e róprias pouco definidas (Dubey & Frenkel, 1972). Muitos esquizontes do tipo B permanecem no mesmo VP após várias divisões

e formam grandes estruturas multinucleadas, que possuem numerosos corpos lipídicos e mitocôndria com matriz elétron-densa moderada (Dubey & Frenkel, 1972; Speer, Clark & Dubey, 1998).

O esquizonte do tipo C se desenvolve entre 24 e 32 horas no interior do vacúolo parasitóforo de enterócitos, multiplicando-se por endopoligenia em forma de roseta (Dubey & Frenkel, 1972). Individualmente é alongado com o núcleo subterminal, fortemente positivo para PAS e mede $6,1 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$ (Dubey & Frenkel, 1972). Os esquizontes do tipo C contêm poucos micronemas e grânulos densos, muitos corpos lipídicos e pequenas mitocôndrias (Speer & Dubey, 2005). A forma intermediária do esquizonte do tipo C apresenta vários núcleos com nucléolos evidentes. O vacúolo parasitóforo não contém RMTV e sua membrana é intimamente associada à membrana do esquizonte. Os esquizontes intermediários se desenvolvem por endopoligenia. O VP em torno dos esquizontes do tipo C maduros contém pequenos agregados de material granular, a RMTV e a membrana do vacúolo parasitóforo são intimamente associadas à membrana do esquizonte do tipo C, que apresenta duas mitocôndrias proeminentes, róprrias elétron-densas e grânulos de amilopectina (Speer & Dubey, 2005). Eventualmente, durante a multiplicação ocorre a formação de um corpo residual medindo aproximadamente $2 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$, contendo resíduos de mitocôndria, ribossomos, retículo endoplasmático e grânulos de amilopectina (Speer, Clark & Dubey, 1998; Speer & Dubey, 2005).

Figura 2 – Estágios enteroepiteliais do ciclo de *Toxoplasma gondii* nas células epiteliais superficiais do intestino delgado do gato doméstico



Fonte: Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009.

Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

Entre 32 horas e 15 dias pós-ingestão de cistos teciduais, são observados os esquizontes do tipo D, que são abundantes nas células epiteliais da base das vilosidades intestinais, e após quarenta horas começam a dividir-se em múltiplos núcleos. Por meio de divisão nuclear assimétrica, geram organismos de vários aspectos morfológicos (Dubey & Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). Ultraestruturalmente, os esquizontes do tipo D (5,8 μm x 1,3 μm) apresentam róprias elétrons-densas, preenchidas com material granular e localizadas acima do complexo de Golgi (Speer & Dubey, 2005).

Finalmente, a partir de três até 15 dias pós-infecção já se observam os estágios pré-gametogênese caracterizados pela presença do esquizonte do tipo E, que apresenta um corpúsculo residual com parasitas em forma de roseta (Dubey & Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). Os esquizontes do tipo E surgem a partir de esquizontes do tipo D que escaparam para células vizinhas. Assim, esse tipo celular apresenta características ultraestruturais distintas, como membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) elétron-densa, numerosas e proeminentes mitocôndrias situadas logo abaixo da película do esquizonte do tipo E (4,5 μm x 1,1 μm), apresentam róprias elétrons-densas e diversos corpos granulares e medem cerca de 300 nm a 600 nm de diâmetro (Speer & Dubey, 2005).

Os tipos A, B e C ocorrem de forma sequencial, ou seja, o tipo A conduz à formação dos tipos B e C, e estes amadurecem rapidamente e desaparecem conforme vão surgindo as formas do tipo D (Dubey & Frenkel, 1972). Os gametócitos só são observados na ausência dos tipos A, B e C. Os tipos D e E ocorrem simultaneamente com os gametas, sugerindo que estes sejam precursores dos gametas ou variantes do mesmo estágio biológico evolutivo (Dubey & Frenkel, 1972; Speer & Dubey, 2005).

As fases evolutivas dos tipos A, B, C, D e E parecem ser exclusivas do ciclo do toxoplasma, uma vez que, em estudos com outros coccídeos, estes tipos nunca foram observados (Dubey & Frenkel, 1972). Durante a gametogênese, ocorre a formação dos microgametas (5,7 μm x 3,5 μm), que possuem o núcleo bastante pequeno e dois flagelos longos, uma única mitocôndria, núcleo elétron-denso e complexo membranar interno com aproximadamente 12 microtúbulos. O VP é preenchido por material elétron-lucente (Speer & Dubey, 2005). Os macrogametas (8,1 μm x 6,0 μm) contêm todas as organelas comuns ao gênero, além de corpos formadores de parede de tipos I e II, corpos lipídicos e grânulos de amilopectina. O VP contém material levemente granular, moderadamente elétron-denso e com poucos vacúolos granulares (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005).

Os microgametas, quando saem das células da parede intestinal, caem na luz intestinal e são atraídos por quimiotaxia até os macrogametas (Dubey & Frenkel, 1972; Speer & Dubey, 2005). A fecundação ocorre nas células intestinais, dando origem ao ovo ou zigoto, que após formar sua parede se diferencia para oocisto imaturo e rompe os enterócitos, sendo liberado juntamente com as fezes dos felídeos no meio ambiente, onde ocorrerá a esporogonia (Dubey & Frenkel, 1972; Speer & Dubey, 2005).

Gatos domésticos podem excretar milhões de oocistos imaturos após ingerirem apenas um bradizoíta ou um cisto tecidual (Dubey, 1998a; Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Geralmente, menos de 1% da população de gatos pode ser encontrada liberando oocistos. Os oocistos são liberados por apenas um curto intervalo de tempo (de uma a duas semanas) na vida do gato (Jones & Dubey, 2010).

Um estudo recente revela que em condições naturais os gatos domésticos podem eliminar oocistos depois de uma primoinfecção por até três semanas, principalmente na primeira semana (Jones & Dubey, 2010). Em condições de laboratório, gatos com bom estado imunitário podem reeliminar oocistos quando alimentados com cistos teciduais seis dias após a primeira infecção (Dubey, 1995). Infecções concomitantes, desnutrição e imunossupressão também podem favorecer uma nova liberação de oocistos (Dubey, 1995; Dubey, Lindsay & Lappin, 2009).

Desta forma, os felídeos – principalmente os gatos domésticos – fazem o papel de disseminadores do parasita e hospedeiros definitivos, e liberam no ambiente uma grande quantidade de oocistos, que, quando esporulados, podem permanecer viáveis por muitos meses ou anos, contaminando o solo, água e alimentos (Dubey & Frenkel, 1972; Speer, Clark & Dubey, 1998; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Hill & Dubey, 2002; Dubey, 2004; Jones & Dubey, 2010).

A quantidade e o número de vezes que os gatos eliminam naturalmente oocistos na natureza ainda não estão bem esclarecidos. Essa questão apresenta algumas dificuldades: além do número baixo de animais que eliminam oocistos em investigações parasitológicas (< 1%), a detecção de oocistos nas fezes apresenta vários problemas técnicos, incluindo a baixa sensibilidade dos testes imunológicos utilizados; semelhança morfológica com oocistos de *Hammondia hammondi* (e outros coccídeos); e os diagnósticos moleculares ainda apresentam reatividade cruzada com outros protozoários, além do elevado custo (Jones & Dubey, 2010).

Devemos ressaltar também que oocistos de *T. gondii* são altamente resistentes ao meio ambiente e suas influências, incluindo o congelamento, podendo permanecer até 54 meses viáveis na água fria (Dubey, 1998). Oocistos também não são inativados pelos tratamentos físicos e químicos tradicionais em estações de tratamento de água, incluindo a cloração, o tratamento de ozônio e os raios ultravioleta (Jones & Dubey, 2010).

CICLO DE VIDA DE *TOXOPLASMA GONDII*

A transmissão da toxoplasmose pode ocorrer basicamente por duas vias: horizontal, pela ingestão oral de oocistos liberados no ambiente junto com as fezes de gatos, ou de cistos teciduais encontrados em carne crua ou em vísceras cruas ou malcozidas dos hospedeiros intermediários; e pela via vertical, por transmissão transplacentária dos taquizoítas. *T. gondii* é disseminado por praticamente todos os animais de sangue quente, como aves e mamíferos, incluindo os seres humanos, em cujo organismo ocorre apenas a reprodução assexuada do parasita, atuando como seus potenciais hospedeiros intermediários e reservatórios. Em muitos hospedeiros os taquizoítas podem também ser transmitidos pelo leite. Assim, o parasita circula do hospedeiro definitivo para o intermediário ou vice-versa, bem como entre os hospedeiros definitivos e entre os hospedeiros intermediários (Dubey, 2002; Hill & Dubey, 2002; Dubey, 2004). De qualquer modo, a prevalência da infecção não é confinada exclusivamente à presença do hospedeiro definitivo, fazendo que seu ciclo de vida continue por meio da transmissão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

Além disso, as vias de transmissão são as mais amplas possíveis, envolvendo a água, solo e ar e potencialmente veículos de disseminação como insetos e vermes (Jones & Dubey, 2010).

Nas últimas décadas, a infecção por *T. gondii* por meio da água vem ganhando mais importância. Um marco desse registro é o relato de um surto no Brasil envolvendo 155 pessoas que consumiram água de um poço artesiano contaminada com fezes de gatos (Moura *et al.*, 2006). No Brasil, a falta de tratamento da água tem sido relatada como uma importante fonte de infecção em regiões com toxoplasmose endêmica, entre a população de classe socioeconômica baixa (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Além disso, a cada ano aumentam os relatos de mamíferos aquáticos apresentando toxoplasmose, indicando a contaminação e veiculação do parasita pela água, inclusive do mar (Dubey & Jones, 2008).

Para melhor compreensão das vias de transmissão de *T. gondii*, os ciclos biológicos serão apresentados com base nas formas de transmissão predominantes.

Transmissão Ambiental

O ciclo ambiental ou fecal-oral de *T. gondii* se desenvolve logo após a ingestão de oocistos presentes no solo, na água não tratada, sobre frutas e verduras mal lavadas ou veiculados por insetos, aves e/ou pequenos roedores sinantrópicos (Dubey, 2004; Jones & Dubey, 2010).

No estômago, enzimas proteolíticas destroem a parede do oocisto, liberando os esporozoítas na luz intestinal, os quais invadem ativamente as células intestinais epiteliais superficiais. No interior das células, localizam-se sempre em vacúolos parasitóforos, e no seu interior se convertem imediatamente em taquizoítas iniciando sua reprodução rápida, por endodiogenia (Speer & Dubey, 2005; Ferguson, 2009). Dessa forma, o parasita atravessa rapidamente as células epiteliais intestinais e alcança outros tipos celulares em diversos tecidos por meio da circulação sanguínea e/ou linfática, mantendo sua multiplicação intracelular rápida por endodiogenia (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

A mudança no ritmo de multiplicação do parasita é provocada pela resposta imunológica do hospedeiro relacionada à regulação na produção principalmente das citocinas IL-10, TGF- β , IL27 e IL-12 pelos linfócitos TCD4+, que modulam a patogênese da toxoplasmose sistêmica e local (Gaddi & Yap, 2007). O processo de endodiogenia passa a ocorrer de forma lenta com interconversão dos taquizoítas em bradizoítas e formação de cistos teciduais (Dubey, 1998; Gaddi & Yap, 2007). Embora os fatores imunológicos do hospedeiro participem decisivamente da modulação da multiplicação e interconversão de *T. gondii*, estudos sugerem que há uma base genética para a virulência do parasita, ou seja, cepas do tipo I (virulentas) tendem a manter uma taxa de replicação acelerada, enquanto cepas dos tipos II e III (avirulentas) favorecem o encistamento e cronificação da infecção (Appleford & Smith, 2000).

Transmissão pelo Carnivorismo

Os cistos teciduais são predominantes durante a infecção crônica em todos os hospedeiros de *T. gondii*, mas podem começar a ser produzidos ainda durante a fase aguda (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Dubey & Jones, 2008). Estes são mais frequentemente encontrados no sistema nervoso central, na retina e na musculatura esquelética e cardíaca. Entretanto, também podem ocorrer mais raramente em vísceras como pulmão, fígado e rins (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Dubey & Jones, 2008). Em alguns estudos, demonstra-se a existência de tropismo maior para formação de cistos cerebrais em pequenos roedores, independentemente da cepa de *T. gondii*, enquanto para grandes mamíferos ruminantes – como bovinos, ovinos e caprinos – os cistos são predominantemente musculares (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Dubey & Jones, 2008).

Este ciclo é mais comum e bastante eficiente entre os carnívoros e onívoros que se infectam com cistos teciduais de *T. gondii* após a ingestão de carne crua ou malcozida (Ferguson, 2009). Da mesma maneira que ocorre com os oocistos, a parede cística será digerida por enzimas proteolíticas estomacais, liberando bradizoítas que penetram ativamente na mucosa intestinal ou são endocitados por células fagocíticas, interconvertendo-se em taquizoítas, desta forma acelerando a sua multiplicação, alcançando o leito vascular ou linfático para sua disseminação pelo organismo e novamente iniciando seu encistamento (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Weiss & Kim, 2000; Hill & Dubey, 2002).

Transmissão Transplacentária

A transmissão congênita ou transplacentária da toxoplasmose é resultante da infecção primária materna durante a gravidez ou perto do parto (Montoya & Liesenfeld, 2004). A infecção pode ocorrer pela ingestão de oocistos ou cistos teciduais, com a liberação de esporozoítas ou bradizoítas, respectivamente, e o desenvolvimento do ciclo

intracelular dos parasitas que determinará sua conversão em taquizoítas. Alcançando a circulação materna, os taquizoítas atravessam a barreira fetoplacentária e proliferam irrestritamente nos tecidos fetais imunologicamente imaturos (Kravetz & Federman, 2005). As consequências deste tipo de infecção irão depender principalmente da idade gestacional no momento da infecção, variando desde o aborto a lesões neurológicas ou oculares no nascimento, ou ainda pode ocorrer uma infecção latente, em que os sinais clínicos irão se manifestar meses ou anos após o nascimento (Montoya & Liesenfeld, 2004; Kravetz & Federman, 2005).

Outras Formas de Transmissão do Toxoplasma

Além das formas de transmissão do toxoplasma já citadas, é possível relacionar algumas de pouco valor epidemiológico e que apresentam baixos riscos de transmissão. Estas vias estão relacionadas à falta de cuidados com a manipulação de material infectado ou ainda a acidentes laboratoriais.

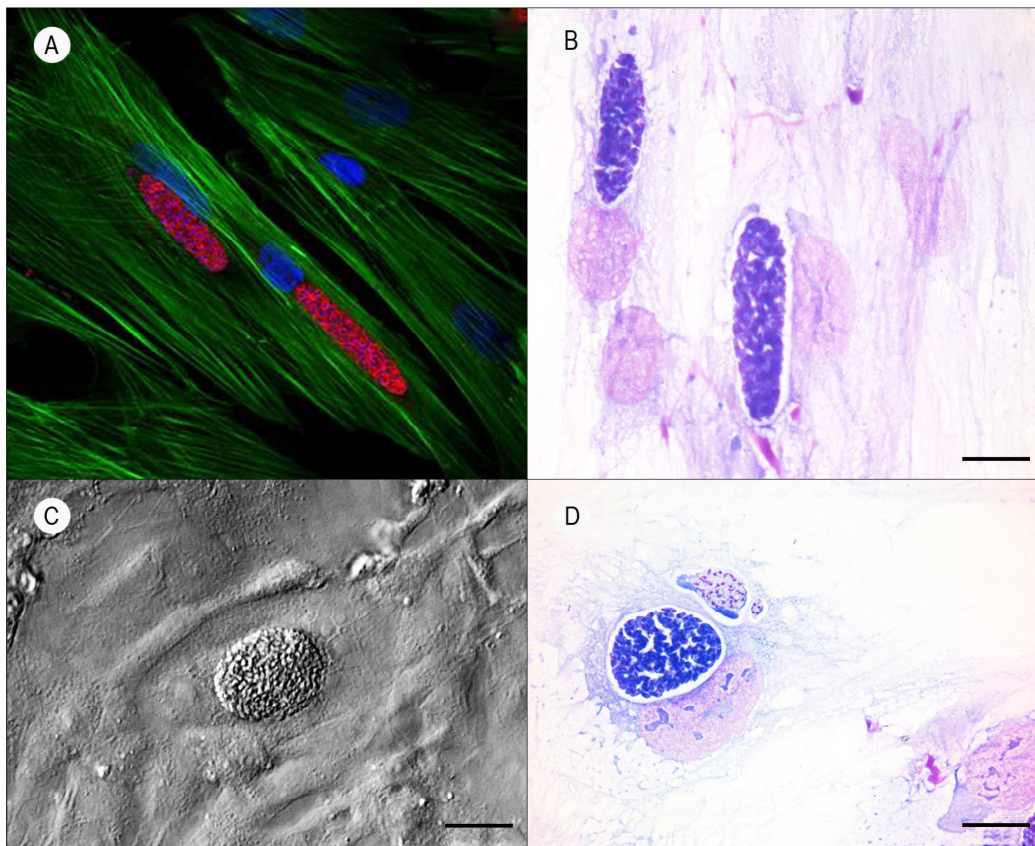
O leite materno, de vaca ou de cabra pode conter e eliminar taquizoítas durante uma infecção aguda, sendo assim potencialmente infectante. A transmissão também pode ocorrer por transfusões de sangue, e transplantes de tecidos e órgãos, quando cistos presentes nos tecidos transplantados são provavelmente a fonte da infecção (Hill & Dubey, 2002; Montoya & Liesenfeld, 2004). Outro tipo de transmissão de pouca relevância epidemiológica está relacionado à infecção por acidentes laboratoriais, que ocorrem principalmente pela manipulação e ingestão de oocistos esporulados em amostras de fezes de felinos ou através da inoculação ou contato direto com taquizoítas ou bradizoítas, isolados de amostras animais, humanas ou de cultivos celulares (Herwaldt, 2001).

PERSPECTIVAS DO ESTUDO DO CICLO DE *TOXOPLASMA GONDII*

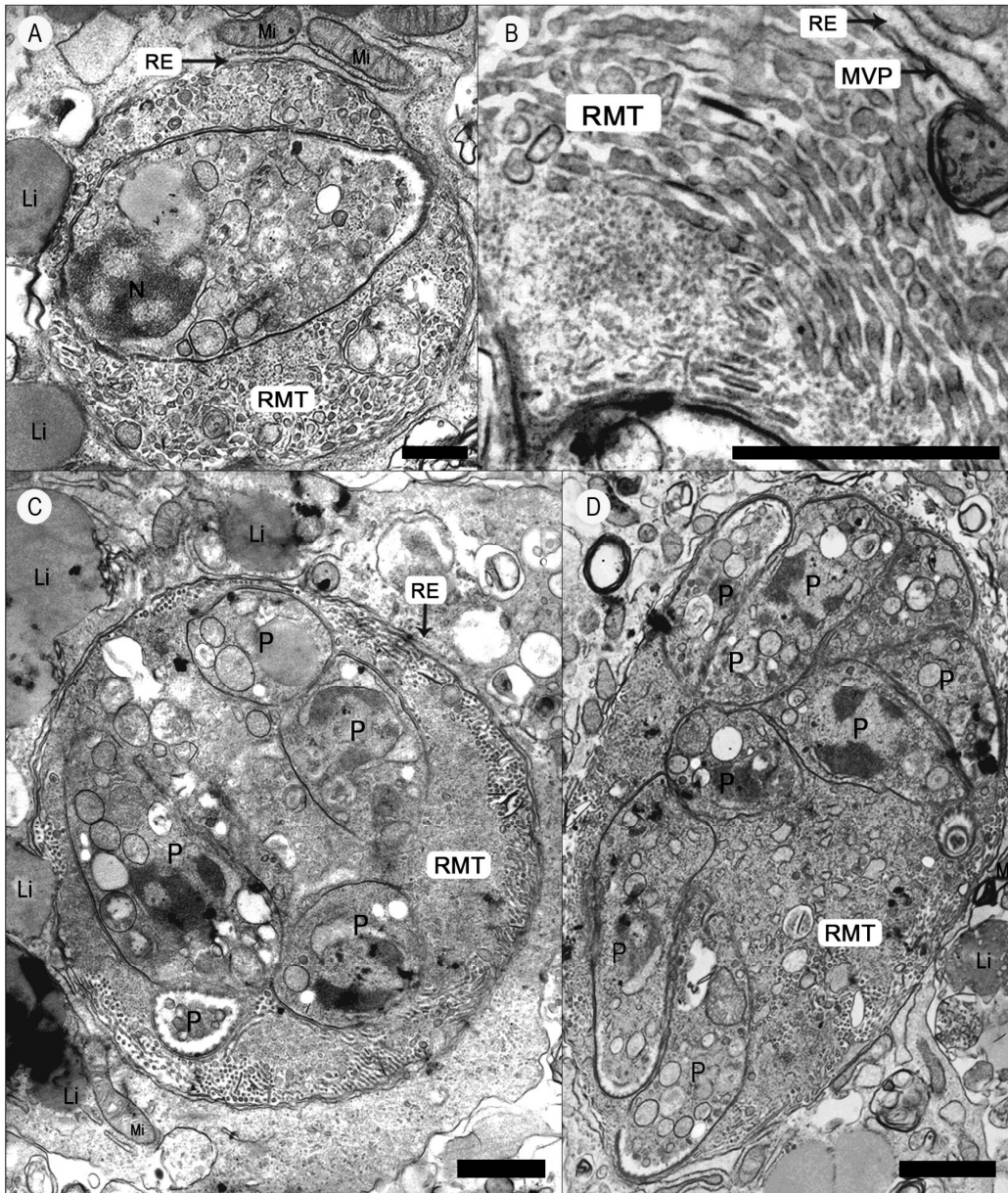
Em estudos recentes, demonstra-se a possibilidade da reprodução parcial do ciclo enteroepitelial de *T. gondii* em culturas primárias de enterócitos felinos (Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009). A relação parasita-célula hospedeira é um aspecto crucial para o destino intracelular de *T. gondii* nessas células. Por exemplo: a conversão bradizoíta-taquizoíta é observada 72 horas após a infecção (h.p.i.) e os VPs apresentam exclusivamente taquizoítas, como visualizados pela marcação com anticorpo SAG-1 (Figura 3-A). Na revelação de filamentos de actina (Figura 3-A), pode-se observar que os VPs adquirem a forma das culturas primárias epiteliais intestinais de felino (CEIF) sem comprometer seu alinhamento e polarização (Figura 3-A) e visto também por coloração de Giemsa (Figura 3-B). A utilização da relação de 1:10 (parasita-célula hospedeira) mostra a formação de estruturas semelhantes a cistos intracelulares com seis dias após a infecção (d.p.i.) (Figura 3-C). A análise por microscopia de luz de culturas coradas com Giemsa permitiu observar VPs morfologicamente diferentes, com estruturas no seu interior semelhantes a sincícios (Figura 3-D). Nessas mesmas condições, por análise ultraestrutural revelaram-se, pela primeira vez *in vitro*, enterócitos contendo vacúolos com apenas um parasita na matriz vacuolar, repleta da rede membranar tubulovesicular bem desenvolvida, como observado na Figura 4-A e em detalhe na Figura 4-B. Esta é uma forte evidência de que a sinalização ou modulação molecular estaria desencadeando a diferenciação de bradizoítas em esquizontes do tipo A para o tipo B, à semelhança do que tem sido descrito no intestino de gatos *in vivo* (Speer & Dubey, 2005). Perfis de retículo endoplasmático, mitocôndrias e corpos lipídicos da célula hospedeira foram sempre observados em associação com a membrana dos VPs (Figura 4-A). Além da caracterização ultraestrutural de esquizontes do tipo B, foi possível a observação de esquizontes em divisão do tipo endodiogenia assincrônica, típica da fase assexuada dos estágios enteroepiteliais (Figura 4-C e D). Os esquizontes desorganizados foram vistos no interior de VPs sem a formação característica de rosetas típicas, imersos na rede membranar tubulovesicular bastante desenvolvida (Figura 4-C e D).

Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

Figura 3 – Interação de bradizoítas de *Toxoplasma gondii* cepa ME49 com culturas primárias epiteliais intestinais de felino



Relação 1:5 parasita-célula hospedeira 72 horas após infecção (h.p.i.). A – Nota-se a presença do vacúolo parasitóforo contendo exclusivamente taquizoítas, confirmada pela imunomarcagem com anticorpo anti-SAG-1/TRITC (vermelho). Filamentos de actina revelados com Faloidina-FITC (verde) e núcleos marcados com DAPI (azul). B – Coloração por Giemsa mostra um vacúolo contendo taquizoítas. Interação na relação 1:10 parasita-célula hospedeira. C – Formação de estruturas císticas com 6 d.p.i. observadas por microscopia interferencial. D – Coloração por Giemsa – microscopia de luz. Nota-se, além da forma cística, um vacúolo parasitóforo com parasitas em formação sincicial (cabeça de seta). Barra de 20 nm.

Figura 4 – Formação de esquizontes precusores dos estágios enteroepiteliais de *Toxoplasma gondii* *in vitro* com 6 d.p.i.

A – Observa-se o vacúolo parasitóforo frouxo, repleto da rede membranária tubulovesicular (RMT). Nota-se a MVP associada a perfis de retículo endoplasmático (RE), Mitocôndria (Mi) e lipídios (Li). B – Detalhe em grande aumento da característica morfológica do vacúolo parasitóforo apresentando RMT bem desenvolvida no seu interior. C e D – Parasitas em divisão por endodigonia assincrônica. C – vacúolo parasitóforo contendo cinco parasitas (P) em processo de divisão no interior de vacúolo parasitóforo rico em RMT com associação de RE e Li à MVP. D – Outra célula em que se observa número ímpar de parasitas no vacúolo parasitóforo ($n = 9$) indicativo de divisão assincrônica. Barra de 500 nm.

Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

A reprodução de alguns estágios enteroepiteliais de *T. gondii in vitro* ratifica a hipótese de que este ciclo deva ser orquestrado e modulado por moléculas presentes nos enterócitos de felinos, tendo em vista o alto grau de especificidade do parasita por esse único hospedeiro definitivo (Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009).

A introdução desse modelo celular na investigação do ciclo entérico de *T. gondii* abre as seguintes perspectivas: substituição gradativa do modelo animal para esses estudos; possibilidade de contribuir com novos subsídios sobre a biologia celular do parasita; possibilidade de explorar os aspectos moleculares desta interação que contribuam, por exemplo, para o desenvolvimento de novas estratégias visando à intervenção numa das principais vias de disseminação da toxoplasmose.

REFERÊNCIAS

- APPLEFORD, P. J. & SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *International Journal for Parasitology*, 30: 1.187-1.191, 2000.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al.* Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 55-62, 2003.
- BARBOSA, H. S. *et al.* Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *The Journal of Parasitology*, 91: 182-184, 2005.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J. & BEN RACHID, M. S. Toxoplasmosis, the mother and the child. *Archives Françaises de Pédiatrie*, 22: 1.183-1.200, 1965.
- DE SOUZA, W. Aspectos ultraestruturais do processo de divisão do *Toxoplasma gondii*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 8: 45-65, 1974.
- DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *The Journal of Parasitology*, 81: 410-415, 1995.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1.019-1.024, 1998.
- DUBEY, J. P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *The Journal of Parasitology*, 88: 713-717, 2002.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126: 57-72, 2004.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39: 877-882, 2009.
- DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of Protozoology*, 19: 155-177, 1972.
- DUBEY, J. P. & JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38: 1.257-1.278, 2008.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. & SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 267-299, 1998.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. & LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39: 1009-1034, 2009.
- FERGUSON, D. J. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology*, 34: 347-360, 2004.
- FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 133-148, 2009.
- FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*, 23: 343-352, 1973.
- GADDI, P. J. & YAP, G. S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunology and Cell Biology*, 85: 155-159, 2007.

- GUIMARÃES, E. V.; CARVALHO, L. & BARBOSA, H. S. An alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 915-917, 2003.
- GUIMARÃES, E. V. *et al.* Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization. *Micron: The International Research and Review Journal for Microscopy*, 38: 651-658, 2007.
- HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 659-688, 2001.
- HILL, D. & DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8: 634-640, 2002.
- HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206: 961-962, 1965.
- JONES, J. L. & DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis: recent developments. *Experimental Parasitology*, 124: 10-25, 2010.
- KRAVETZ, J. D. & FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. *Association of Professors of Medicine*, 118: 212-216, 2005.
- MONTOYA, J. G. & LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363: 1.965-1.976, 2004.
- MOURA, L. *et al.* Waterborne outbreak of toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 326-329, 2006.
- MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R. & BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 862-864, 2009.
- SABIN, A. B. & OLITSKY, P. K. Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. *Science*, 85: 336-338, 1937.
- SPEER, C. A. & DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *International Journal for Parasitology*, 35: 193-206, 2005.
- SPEER, C. A.; CLARK, S. & DUBEY, J. P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 84: 505-512, 1998.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. & WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30: 1.217-1.258, 2000.
- WEINMAN, D. & CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87: 211-216, 1954.
- WEISS, L. M. & KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 5: D391-405, 2000.

3.4. Resultados Complementares

Atendendo aos objetivos (1): “Avaliar comparativamente a suscetibilidade de epitélio renal de felinos (CRFK) e epitélio renal de macaco (Vero) à infecção por bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) com diferentes cargas infectivas” e, (2) “Caracterizar o destino intracelular de bradizoítos de *T. gondii* (cepa ME49) em células epiteliais de diferentes tecidos e origens” foram gerados os seguintes resultados complementares:

1. Materiais e métodos

1.1. Manutenção de linhagens celulares epiteliais

A linhagem celular Vero, oriunda do epitélio normal do córtex renal de macaco verde (ATCC® CCL-81™), foi semeada na concentração de $1,0 \times 10^5$ /mL em garrafas de cultura celular de 25 cm² (Gibco BRL, UK), em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/Hams F12 - Sigma-Aldrich), suplementado com 1% solução de antibiótico (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab). As células foram mantidas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, metade do meio era descartado e o mesmo volume de meio fresco era adicionado. As células foram cultivadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Neste ponto, as células foram tratadas com solução de dissociação: salina tamponada com fosfato (PBS), suplementado com 0,01% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,25% de tripsina durante 5 min a 37°C. Após dissociação, à suspensão celular foi adicionada meio DMEM com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina e centrifugada durante 7 min a 650g a mesma temperatura. Procedeu-se então, a quantificação das células em câmara de Neubauer e o seu cultivo em placas de 24 poços sobre lamínulas (densidade celular de 8×10^4 células/poço).

1.2. Obtenção dos parasitos

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 pesando entre 15-18g foram inoculados por via intraperitoneal com cerca de 50 cistos teciduais, previamente infectados com *T. gondii* da cepa avirulenta ME49 (cedida pelo Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil). Assim, 4-8 semanas pós-infecção, os cistos teciduais foram isolados e purificados do cérebro dos camundongos

para posterior utilização nos ensaios experimentais e para manutenção da cepa (Guimarães e cols., 2008). Em resumo, os cérebros dos camundongos foram isolados, lavados e homogeneizados em PBS, colocados em gradiente de 25% de Dextran, para purificação, objetivando separar os cistos dos debris celulares. Para obtenção de bradizoítos, os cistos foram incubados sob agitação por 1-5 min a 37°C, numa solução aquosa de pepsina ácida diluída na proporção 1:5 (pepsina ácida: cistos) visando o rompimento da parede cística. Para neutralização da atividade enzimática foi utilizada a solução de 1% carbonato de sódio. Os parasitos foram lavados 3 vezes, em meio DMEM/Hams F12, e a quantificação dos parasitos isolados foi determinada usando câmara de Neubauer, para utilização imediata nos experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira.

1.3. Interação parasito-célula hospedeira

As culturas de linhagens celulares epiteliais foram semeadas em placas de 24 poços com cerca de 8×10^4 células por poço. Após 24 h as culturas foram infectadas com bradizoítos de *T. gondii*. Os ensaios de interação foram realizados na proporção de 1:10 (parasito-célula hospedeira) durante períodos que variaram de 1 a 6 dias pós-infecção. Após lavagem em PBS, as amostras controles (não infectadas) e as infectadas foram fixadas e processadas de acordo com os ensaios a serem desenvolvidos.

1.4. Ensaios de quantificação da infectividade

As culturas celulares após a interação parasito-célula hospedeira (24-96 h) foram fixadas em solução de Bouin por 5 min, lavadas com água destilada e coradas por 60 min em solução de 10% Giemsa diluída em PBS. Após a coloração, as lamínulas foram desidratadas em bateria decrescente/crescente de acetona-xilol e montadas em resina Permunt (Fischer Scientific, Massachusetts - EUA). A análise quantitativa foi realizada a partir de três experimentos independentes, em duplicata, sendo quantificadas 400 células por lamínula. Os dados foram expressos em percentual de células infectadas.

1.5. Monitoramento dos estágios evolutivos de *T. gondii*

A caracterização dos estágios evolutivos de *T. gondii* em culturas de linhagens epiteliais foi monitorada por meio de sondas. Para identificação por imunomarcação de taquizoítos foi utilizado o anticorpo contra p30 (Santa Cruz, Dallas, Texas - EUA), que reconhece especificamente a proteína SAG1 encontrada na superfície externa da membrana plasmática deste estágio. Para identificação de cistos de *T. gondii* foi utilizada a lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich, EUA), que se liga especificamente a grupamentos N-acetil-galactosamina presentes na parede cística (Zhang e cols. 2001). Inicialmente, as células nos períodos de 1 a 10 dias de infecção foram fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em PBS por 5 min a 25°C, lavados 3 vezes em PBS. Após incubação em 50 mM cloreto de amônia por 30 min, para bloqueio dos radicais aldeídos livres, as células foram permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% BSA (Sigma-Aldrich) por 20 min. Para o ensaio de imunofluorescência indireta, as culturas foram incubadas por 2 h a 37°C com anticorpo primário contra p30 diluído 1:100 em PBS contendo 4% BSA. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 4% BSA e reincubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário (IgG contra camundongo conjugado com FITC) na diluição de 1:600 em PBS contendo 4% BSA. Para fluorescência direta, foi utilizada a lectina DBA-TRITC diluída 1:50 em PBS durante 1 h. Após a lavagem em PBS, as culturas foram incubadas por 10 min com um intercalante de DNA, DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol, Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em PBS, lavadas uma vez em PBS, montadas em lâmina com DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano- trietilenodiamina - "antifading", Sigma-Aldrich). Os controles das reações foram realizados na ausência do anticorpo primário e para a lectina DBA foi realizado um ensaio de competição com a adição de 50 mM de N-acetil-galactosamina (GalNAc). As amostras foram analisadas com o microscópio de varredura confocal a laser (LSM 510 META/AxioVert, Zeiss, Alemanha) usando o laser 543 Hélio (LP560 filtro), laser 488 Argônio / Krypton (Ar/Kr) (filtro LP515) e o laser 405 Diiod (LP 420 filtro).

1.6. Análise ultraestrutural da interação parasito-célula hospedeira

1.6.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Culturas de células Vero semi-confluentes foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 min e infectadas na relação 1:10 (parasito-célula hospedeira) com estágios bradizoítos de *T. gondii* por períodos que variaram de 1 a 13 dias de infecção. As culturas infectadas foram fixadas por 1 h a 4°C com 2,5% glutaraldeído diluído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM cloreto de cálcio (pH 7.2). Após a fixação, as culturas foram lavadas e pós-fixadas numa solução de 1% de tetróxido de ósmio, por 1 h, no mesmo tampão e lavadas. A seguir, as células foram destacadas do substrato com auxílio de um raspador de células (“rubber policeman”) a 4°C e centrifugadas por 5 min a 10,000g. Posteriormente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina epoxi (Poly/Bed® 812 – Polysciences). Cortes ultrafinos foram recolhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo para análise ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011 da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz.

1.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As lamínulas contendo as culturas de células Vero após cultivo de 1 a 13 dias de infecção foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas como descrito no item anterior. A secagem das amostras foi realizada pelo método do ponto crítico, sendo as lamínulas montadas com cola de prata em suportes de alumínio e revestidas com uma camada de ouro na espessura de 20 nm. As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV com aceleração de voltagem de 15 kV da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz. Técnica de retirada da membrana da célula hospedeira com ajuda de fita adesiva, logo após secagem pelo ponto crítico, foi empregada, a fim de visualizar o interior das células com alta resolução pela MEV, o que possibilitou a análise do destino intracelular do parasito ao longo da interação *T. gondii*-célula hospedeira.

2. Resultados

2.1. Infectividade de bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 frente às células Vero

A análise quantitativa da interação de bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 frente às culturas de células Vero, a partir da carga infectiva de 1:10, mostrou que $4,7 \pm 2,7$ % de células estavam infectadas após 24h, sendo observada a presença de VP contendo parasitos em duplas (Fig. 1A). Após 48 h cerca de $17,3 \pm 10$ % das células apresentavam parasitos intracelulares, com a visualização de rosetas, indicativo do processo de replicação por endodiogenia por taquizoítos, caracterizando a estágio-conversão de bradizoíto-taquizoíto (Fig. 1B). Simultaneamente, foram detectadas regiões das lamínulas com parasitos no meio extracelular, indicativo do estabelecimento do ciclo lítico com egresso dos taquizoítos (Fig. 1C). Estruturas organizadas a semelhança de cistos, “cisto-like” (CL) foram detectadas após 72 h de infecção (Fig.1D). Ao mesmo tempo, algumas células mostraram VP com parasitos individualizados, sugerindo a reinfecção destas células e cerca de $13,7 \pm 3$ % de células infectadas (Fig. 1E). Com 96 h foi verificado que $24,3 \pm 2,1$ % das células estavam infectadas, contendo estruturas semelhantes a cistos (Fig. 1F). Em contrapartida, foram observadas muitas regiões com parasitos no meio extracelular (Fig. 1G), além de células recém infectadas simultaneamente (Fig. 1H) sugerindo um novo ciclo lítico.

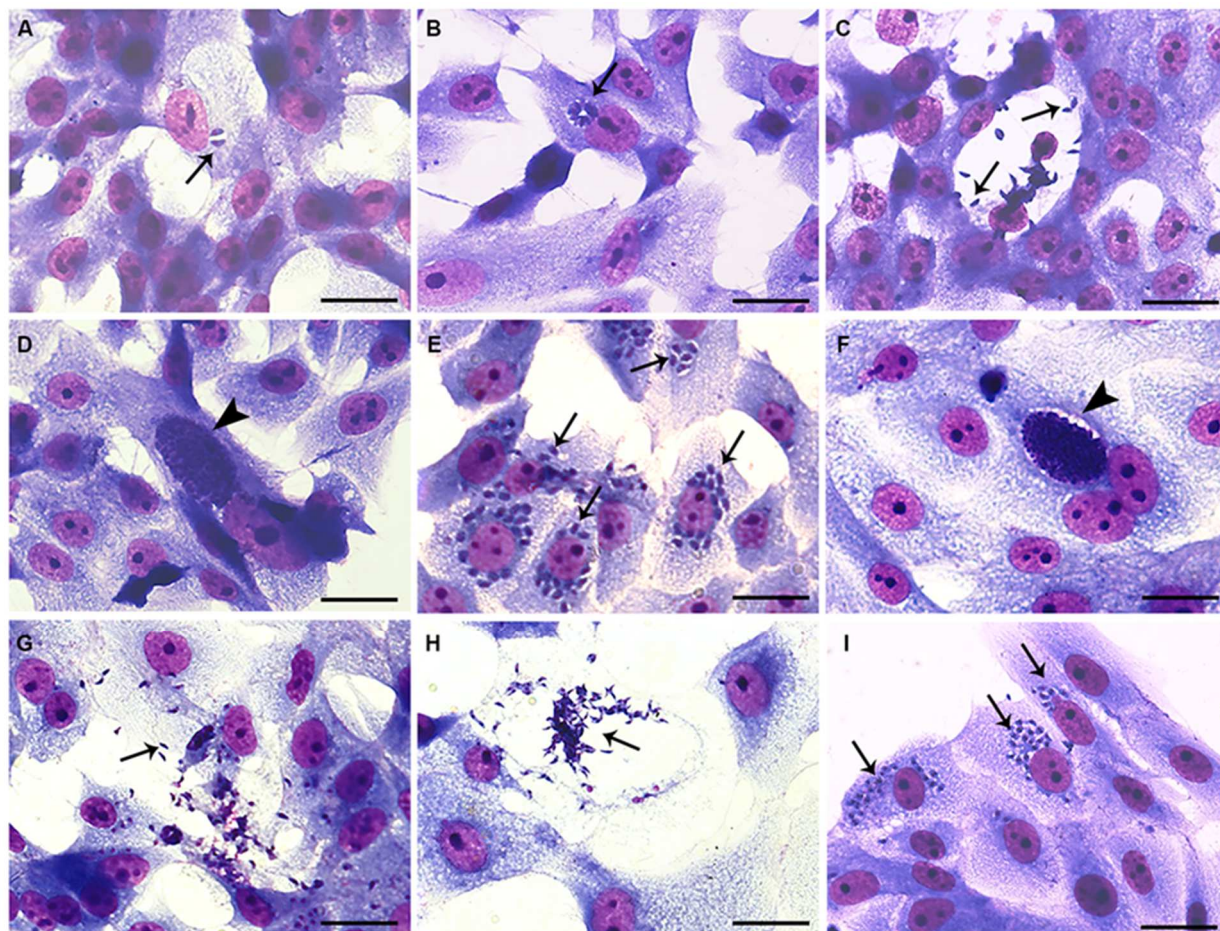


Figura 1: Culturas de Vero infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 e coradas por Giemsa. (A) VP com dois protozoários no interior (seta) em 24 h de infecção; (B) Roseta de parasitos (seta) após 48 h de interação; (C) Parasitos no meio extracelular (seta), com 48 h; (D) Estrutura semelhante a cisto (CL) (cabeça de seta), com 72 h de interação; (E) Parasitos individualizados em diversos vacúolos (setas); (F) Estrutura CL (cabeça de seta), com 96 h de interação; (G-H) Parasitos no meio extracelular (setas) com 96 h; (I) Parasitos individualizados em diversos vacúolos (setas). Barras = 20 μ m.

2.2. Monitoramento da cistogênese em Vero

Os ensaios de citoquímica confirmaram, através da incubação das células com a lectina DBA, a formação de cistos de *T. gondii* após 3 dias nas culturas de células Vero, (Fig. 2 A-C). Os cistos foram observados até 5 dias de cultivo (Fig. 2 D-F) Também foi comum a presença de taquizoítos, que foram visualizados em grandes vacúolos (Fig. 2 G-I) ou individualizados (dados não mostrados).

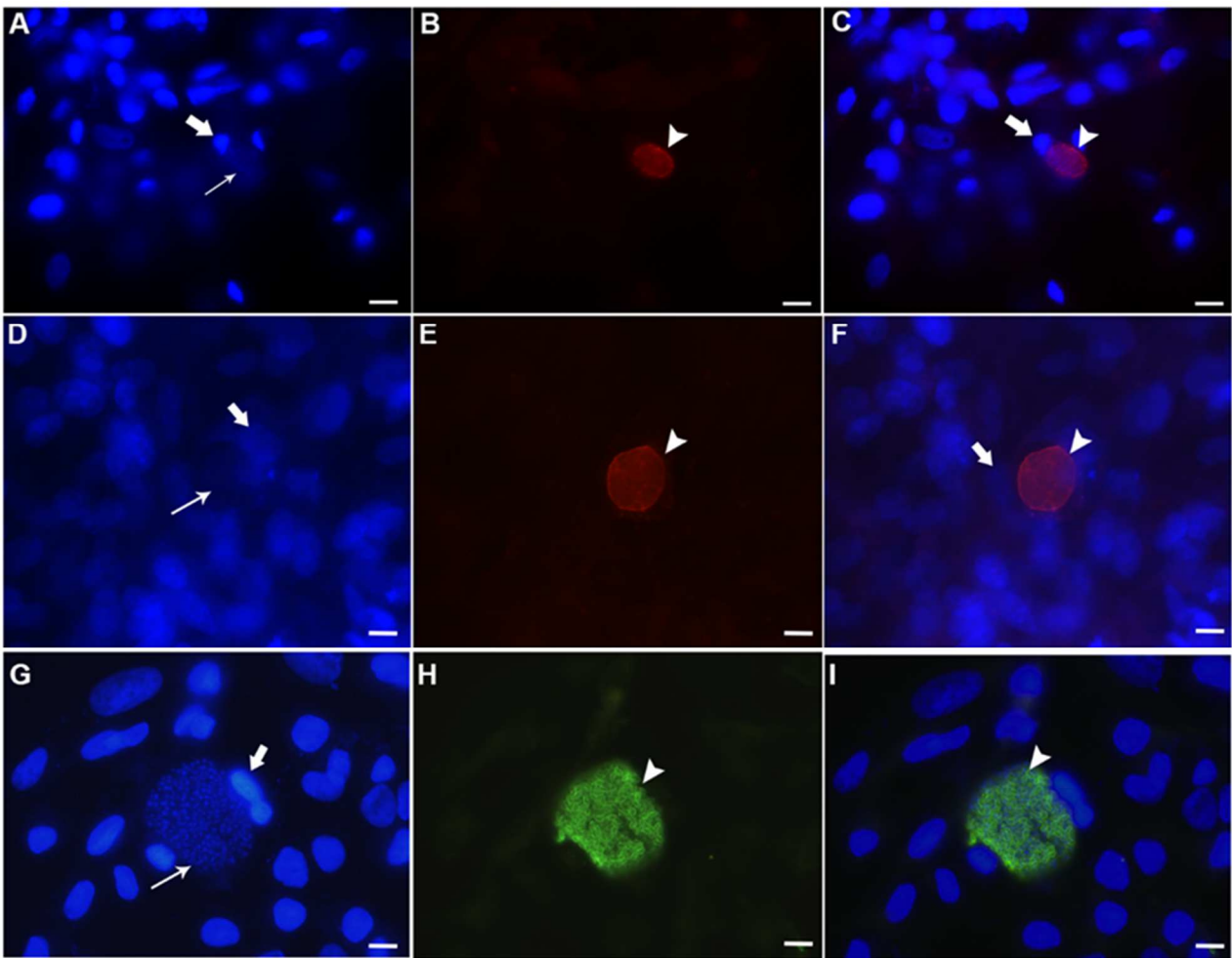


Figura 2: Cistos de *T. gondii* cepa ME49 em culturas Vero. (A, C, D, F, G) Núcleos das células hospedeiras (setas largas) e dos parasitos (setas) revelados por DAPI em azul. (B-C) Cisto revelado por DBA em vermelho (cabeça de seta) com 3 dias de infecção; (E-F) Após 5 dias, cistos maiores (cabeças de seta) foram observados nas culturas; (H-I) Taquizoítos em várias rosetas no interior de um grande VP (cabeças de seta) revelados pelo anticorpo contra P30 em verde. Barras = 10 μ m.

As análises por MEV permitiram a visualização de parasitos no interior das células de 1 até 7 dias de infecção. Estruturas com parasitos justapostos com organização semelhante a cistos foram visualizadas nas culturas Vero partir de 72 h de interação (Fig. 3).

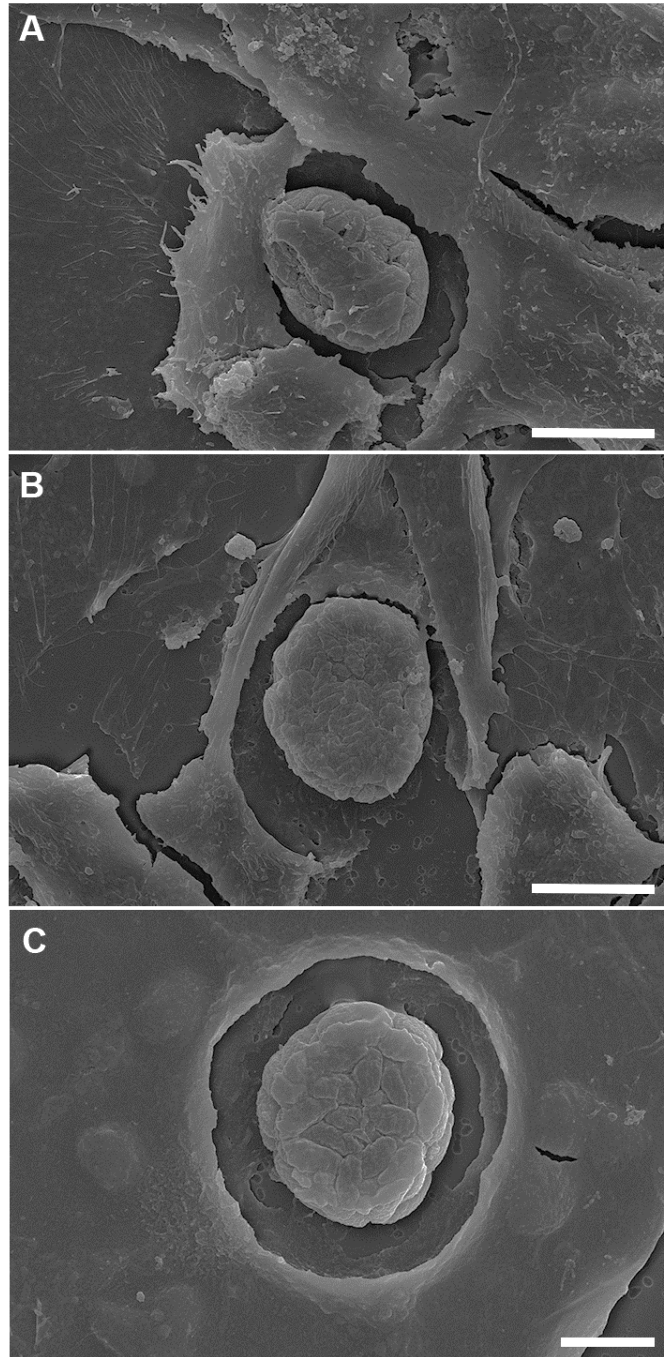


Figura 3: Cistos de *T. gondii* em células epiteliais Vero. (A-C) Células Vero apresentaram estruturas com parasitos justapostos e organizados semelhantes a cistos. A-B = 10 μ m; C = 5 μ m.

Confirmando estes resultados, a análise ultraestrutural de cortes ultrafinos de células Vero com 5 dias de interação com bradizoítos revelou cistos intracelulares muito bem definidos, com parede espessa e eletrondensa, matriz cística bastante eletrondensa e diversos parasitos no seu interior, apresentando grande quantidade de grânulos de amilopectina. Muitas mitocôndrias foram visualizadas nas culturas, característica de células epiteliais oriundas do rim. As mitocôndrias foram visualizadas sempre muito próximas aos cistos, assim como a associação de perfis de retículo endoplasmático da célula hospedeira, sugerindo a interação destas organelas com os cistos (Fig. 4).

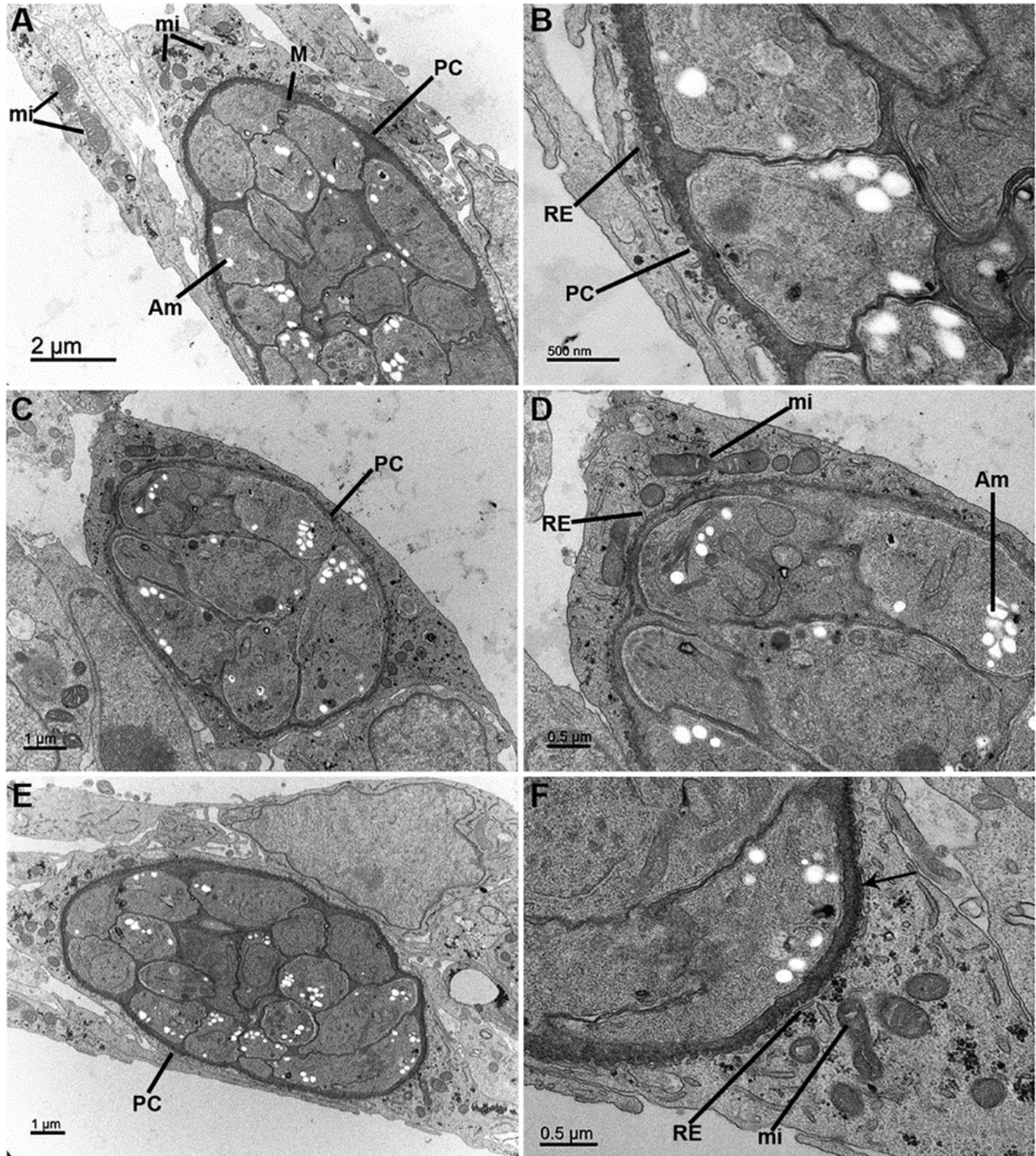


Figura 4: Cistos de *T. gondii* com 5 dias de infecção em células Vero. (A-F) Células apresentam cistos bem definidos, com parede cística (PC) espessa e bem eletrondensa. Matriz cística (M) altamente eletrondensa e diversos parasitos no seu interior, com grande quantidade de grânulos de amilopectina (Am). (F) Detalhe da parede cística (PC) espessa e invaginada (seta). (A, B, D, F) Destaque para mitocôndrias (mi) da célula hospedeira próximas aos cistos e vários perfis de retículo endoplasmático (RE) associados à parede cística.

IV. Discussão

A presente tese explorou aspectos da interação de *T. gondii* e duas células epiteliais (CRFK e IEC-6) demonstrando que a linhagem epitelial de felinos é um modelo celular produtor de cistos teciduais. Adicionalmente, no contexto da inovação, emprega culturas primárias de células epiteliais intestinais de felinos (CEIF) para o estudo do ciclo enteroepitelial do parasito, *in vitro*.

Outro aspecto que merece destaque foi o emprego de estágios bradizoítos como fonte de infecção primária durante a interação do *T. gondii*-células epiteliais. Esta estratégia experimental se diferencia de centenas de outros estudos, onde a infecção com estágios taquizoítos tem gerado a maioria do conhecimento da interação *T. gondii* e diferentes tipos celulares *in vitro* (Skariah e cols., 2010; Chatterton e cols., 2010; Swierzy e cols., 2014; Leng e cols., 2014; Yan e cols., 2015; de Lima e cols., 2015; Blader e cols., 2015) assim como durante os estudos da estágio-conversão taquizoítos-bradizoítos (Soête e cols., 1993; Radke e cols., 2006; Ferreira-da-Silva e cols., 2008, 2009a,b; Weilhammer e cols., 2012; Paredes-Santos e cols., 2013). A escolha de taquizoítos nesses estudos se deve ao protocolo mais simples de obtenção além de ser o estágio responsável pela disseminação do parasito no organismo, após a ingestão de cistos ou oocistos (Dubey e cols., 1998; Ferreira-da-Silva e cols., 2008; Sibley, 2011).

O emprego de bradizoítos como fonte de infecção nos estudos *in vivo* e *in vitro* é bastante restrito (Dubey e Frenkel, 1972; Dubey e Frenkel, 1973; Lindsay e cols., 1991; Weiss e cols., 1995; Dubey e cols., 1998; Ricard e cols., 1999; Speer e Dubey, 2005; Dubey, 2006; Fouts e Boothroyd, 2007; Guimarães e cols., 2008, 2009; Moura e cols., 2009). Uma das justificativas para esta restrição é a necessidade do emprego de grande número de animais para obtenção dos cistos, além de ser um longo e delicado processo de isolamento e purificação dos bradizoítos. A importância de se utilizar este estágio para estudos *in vitro* se deve ao fato de que representa uma das principais vias de transmissão natural da toxoplasmose, através da ingestão de cistos contidos em carnes cruas ou mal cozidas (Tenter, 2009), além de representar uma importante via de infecção para os felídeos. Dubey (2006) confirmou que a infecção de gatos foi mais eficiente após a administração oral de bradizoítos do que de oocistos. O

mesmo autor apontou que bradizoítos foram mais patogênicos para gatos que oocistos, sugerindo que tanto o estágio infectivo quanto o hospedeiro são determinantes para a patogenicidade do *T. gondii*.

A escolha de células epiteliais oriundas de felinos como objeto de estudo da presente tese, se justifica devido à sua grande importância considerando-se que: (i) o ciclo entérico do *T. gondii* ocorre exclusivamente no epitélio intestinal de felinos; (ii) ainda não há tratamento comprovado para toxoplasmose em gatos (Elmore e cols., 2010); (iii) os felinos são os únicos responsáveis pela disseminação de oocistos no meio ambiente com conseqüente contaminação do solo, água e alimentos. Adicionalmente, a caracterização morfológica do ciclo entérico do parasito é limitada a alguns artigos realizados em modelo *in vivo* (Frenkel e cols. 1970; Dubey e Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009) e mais recentemente, a apenas um artigo *in vitro* (Moura e cols., 2009). A reprodutibilidade dos eventos temporais com que o ciclo se estabelece *in vivo* é limitada, sujeito a muitas extrapolações, visto que a análise histológica do intestino, não permite monitorar a seqüência da diferenciação dos estágios infectivos do parasito, sem que se impute análises subjetivas. Na atualidade, a prática da eutanásia de gatos é quase proibitiva (Ferguson, 2009) e, corroborando a necessidade de se introduzir modelos de investigação alternativos para o melhor entendimento desse ciclo.

A linhagem CRFK é um dos únicos modelos epiteliais de felino disponível comercialmente, e se mostrou significativamente mais suscetível à infecção por bradizoítos do que a IEC-6. A CRFK também foi mais susceptível à infecção quando comparada a linhagem Vero (vide resultados complementares). Esses dados reforçam a sugestão de que aspectos moleculares inerentes ao tipo celular e/ou origem celular podem influenciar no comportamento do curso da infecção de *T. gondii*. Essa hipótese tem apoio na alta especificidade do desenvolvimento do ciclo sexuado do parasito que só ocorre nos enterócitos e exclusivamente de felinos, únicos hospedeiros definitivos do parasito.

Interessantemente, as células de felinos e do epitélio de macaco induziram, a partir de 72 h, a cistogênese espontânea *in vitro*, a partir da infecção primária com bradizoítos. Estudos preliminares, durante a quantificação da infecção de IEC-6 não demonstraram que a cistogênese se estabeleça neste tipo celular.

O estudo do processo de cistogênese *in vitro* tem despertado o interesse de alguns pesquisadores, pois é um processo essencial para persistência do parasito nos hospedeiros, permitindo a transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos. A manutenção do parasito nos seus hospedeiros envolve alguns processos, que incluem a diferenciação de estágios acelerados de multiplicação, os taquizoítos, em estágios de baixa atividade metabólica, os bradizoítos (Schlüter e cols., 2014). A obtenção de altos índices de conversão e o estabelecimento da cistogênese *in vitro* foram propostos inicialmente por Soête e cols. (1994) e Dzierszinski e cols. (2004). Esses autores mostraram que manobras experimentais, como por exemplo, aumento de temperatura, alteração de pH, IFN- γ e outras citocinas pro-inflamatórias, resposta a estresse celular, proteínas de choque térmico e fatores de transcrição são condições que podem contribuir para a formação de cistos (revisto por Ferreira da Silva e cols., 2008 e por Swierzy e cols., 2014).

A maioria dos estudos *in vitro* relacionados à conversão taquizoítos \leftrightarrow bradizoítos foi desenvolvida em linhagens celulares, por vários motivos: a facilidade de crescimento destas células, sobrevivência por longos períodos como monocamadas e por ter sido proposto que o tipo celular não é determinante para a formação de cistos tissulares *in vitro*. Alguns autores consideram que a cistogênese sem a utilização de manobras experimentais seja um evento dependente da cepa de *T. gondii*, tendo as cepas avirulentas, como a ME49, a capacidade natural de formar cistos em culturas celulares de mamíferos (Darde e cols., 1989; Lindsay e cols., 1991; McHugh e cols., 1993). Essas questões ainda não foram totalmente esclarecidas. Ferreira-da-Silva e cols. (2008; 2009a, b) descreveram que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes para a formação de cistos *in vitro*, quando compararam linhagens e cultura primária de músculo esquelético com linhagem de fibroblastos. Weilhammer e cols. (2012) mostraram que células com metabolismo glicolítico mais intenso, como os fibroblastos NIH3T3 e células epiteliais 293T foram resistentes à formação de cistos, por favorecerem o crescimento de taquizoítos da cepa Pru (Tipo II, avirulenta), enquanto os fibroblastos HFF e as células epiteliais Vero foram permissivas à formação de cistos. Paredes-Santos e cols. (2013) demonstraram que a cepa EGS (avirulenta) produziu grande quantidade de cistos espontaneamente em células

epiteliais LLC-MK2, fibroblastos HSFS e células da glia C6, porém, após 4 dias de cultivo, esse índice foi maior nas células epiteliais LLC-MK2, quando 72,3% das células infectadas apresentavam cistos de *T. gondii*. Mais recentemente, Swierzy e Lüder (2015) avaliaram que células diferenciadas, como as musculares, seriam um nicho mais favorável à diferenciação de bradizoítos e formação de cistos. Desta forma, esse conjunto de dados corrobora a ideia de que o tipo celular associado ao estado metabólico das células seja decisivo para o sucesso da manutenção do parasito no organismo infectado, reforçando a necessidade da elucidação desse processo com estudos mais direcionados para os eventos que ocorrem *in vivo*, explorando os aspectos inerentes a cada tipo celular envolvido na cistogênese.

Análises quantitativas da produção de cistos marcados com DBA mostraram que cerca de 20% das células CRFK continham cistos com 13 dias de interação (Artigo 1). A quantificação da produção de cistos em células Vero infectadas por tempos mais longos ainda não foram realizadas. Esta análise deverá apontar qual tipo celular poderia ser o de eleição para obtenção de cistos *in vitro*, como será discutido mais adiante.

As análises por MET confirmaram a presença de cistos intracelulares entre 3 (CRFK e Vero) e 13 dias de infecção (CRFK). Contudo, a avaliação do estabelecimento da cistogênese *in vitro* mostra diferentes resultados descritos na literatura: 6-7 dias em células endoteliais da córnea de coelho (Shimada e cols., 1974) e fibroblastos de macacos (Hoff e cols., 1977); 20-21 dias na linhagem celular HeLa (Hogan e cols., 1960) e até 40-80 dias em astrócitos murinos (Jones e cols., 1986). Estas diferenças podem estar relacionadas com a virulência e/ou perfil genotípico das cepas e/ou o estágio infectivo do parasito empregado, como fonte primária da infecção, quer com taquizoítos ou bradizoítos. A velocidade de interconversão entre os estágios infectivos e a quantidade gerada de cistos *in vitro* têm sido relacionadas com o genótipo da cepa de *T. gondii* (McHugh e cols., 1993; Soête e cols., 1994). As cepas de baixa virulência são mais eficientes na formação de cistos em camundongos, tais como, a ME49, que têm maior velocidade de formação de cistos em cultura do que cepas de alta virulência como, a cepa RH (Soête e cols., 1994). Esses dados tem sido confirmados durante o emprego de células musculares esqueléticas *in vitro*, um dos principais nichos para o desenvolvimento da cistogênese *in vivo*

(Ferreira da Silva e cols., 2009b).

No entanto, diferenças morfológicas foram observadas entre os cistos produzidos por células CRFK e Vero, principalmente quanto a eletrondensidade da matriz cística, observada nos cistos produzidos pelas células Vero (Fig. 1). Essas observações estão de acordo com a descrição da maturação de cistos nos sistemas *in vivo* e *in vitro* (Ferguson; Hutchison, 1987; Paredes-Santos, 2015). Para aprofundar os estudos comparativos entre as linhagens Vero e CRFK, quanto a geração de cistos de *T. gondii*, seria interessante explorar por análise bioquímica, o metabolismo energético destes modelos celulares, que pudessem explicar a ocorrência da cistogênese, em células que teoricamente não são as de eleição para formação de cistos no sistema *in vivo*. Essa proposta tem por base os estudos de Weilhammer e cols. (2012).

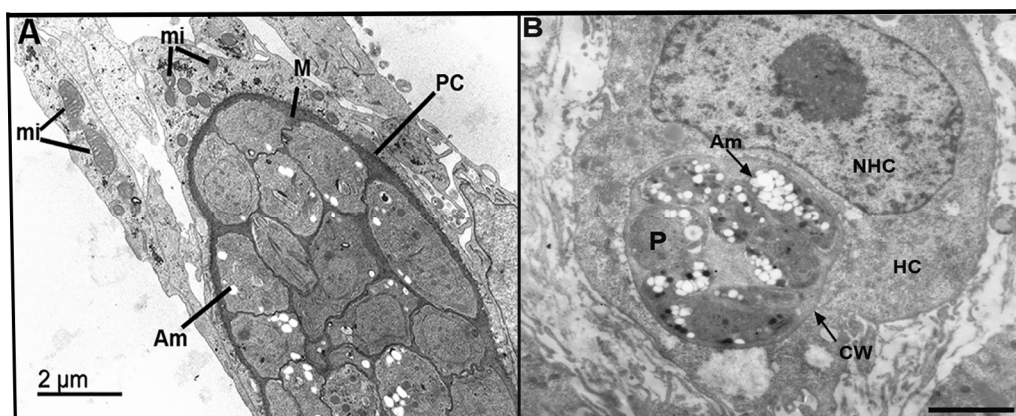


Figura 1: Cistos de *T. gondii* em células Vero versus cistos observados em CRFK (Artigo 1). (A) Cisto confirmado pela presença de parede cística (PC), e a matriz cística (M) bastante eletrondensa; (B) Cisto confirmado em CRFK pela presença de parede cística (CW), parasitos com muitos grânulos de amilopectina e matriz menos eletrondensa (Artigo 1). Barras = 2 μ m; 1 μ m.

Durante o desenvolvimento de cistos *in vivo*, ocorre um claro tropismo para células dos sistemas nervoso e muscular, mas as condições do ambiente celular que influenciam neste tropismo, ainda não foram desvendadas. Evidências sugerem que os cistos são encontrados preferencialmente em células com capacidade proliferativa baixa ou ausente, em função da sua diferenciação,

como as células neuronais e musculares (Coppens e Joiner, 2001; Chai e cols., 2001; Radke e cols., 2006; Swierzy e Lüder, 2015). Surpreendentemente, os ensaios de Weilhammer e cols. (2012) não relacionam a eficiência da conversão dos parasitos com as propriedades de crescimento das células hospedeiras, como as células Vero e 293T (fibroblastos), ambas células de tumor com alta capacidade proliferativa, pois mostraram diferentes habilidades em facilitar a conversão.

Retomando nossos modelos celulares verificamos que as CRFK multiplicam-se a cada 40 h (Lasfargues e cols., 1976) e as células Vero a cada 24 h (Ammerman e cols., 2009). Estabelecer uma correlação desses dados analisando as fases do ciclo celular de cada um dos tipos celulares com a produção de cistos poderia esclarecer se essa variável realmente é um dos fatores da capacidade das células epiteliais induzirem a cistogênese, a despeito de não serem células em final de diferenciação celular, como já preconizado recentemente (Swierzy e Lüder, 2015). Estes dados destoam das evidências de que células epiteliais, especialmente as renais, sejam competentes para o desenvolvimento da cistogênese, espontaneamente, como observado no Artigo 1 e por Paredes-Santos e cols. (2013). Vale ressaltar que o estudo de Weilhammer e cols. (2012) testando a cistogênese em diferentes tipos celulares, não foi capaz de detectar a formação de cistos espontaneamente em células epiteliais, incluindo as Vero, ou fibroblastos, se estabelecendo somente em condições de conversão de bradizoítos (meios de cultura sem bicarbonato com ou sem 5% CO₂). As variáveis que poderiam explicar esses resultados conflitantes, não se relacionam com o genótipo das cepas utilizadas, considerando-se que nos nossos ensaios utilizamos cepas do tipo II, assim como Weilhammer e cols. (2012). A variável que difere foi o emprego de bradizoítos como fonte de infecção, mas que não estão de acordo com os resultados de Paredes-Santos e cols. (2013) infectando células epiteliais com taquizoítos e obtendo altos índices de cistos. Esses dados fomentam ainda mais a investigação dos fatores intrínsecos ou extrínsecos celulares que induzem a cistogênese em células epiteliais.

Outro aspecto importante que deve ser considerado nos nossos resultados foi a demonstração de que diminuindo a carga parasitária para 1:10 (bradizoíto-

célula hospedeira), foi observado maior número de cistos *in vitro* nas células da linhagem CRFK (vide artigo 1). Esses dados apresentam um novo aspecto na interação do *T. gondii*-célula hospedeira: a relevância da carga infectiva neste processo, que estaria em consonância com a aquisição de baixo número de parasitos nas infecções naturais, pela transmissão via a ingestão de carne crua ou mal cozida.

No nosso sistema, empregando células epiteliais, além do estabelecimento da cistogênese, também foram visualizados taquizoítos em rosetas, como revelado por meio da marcação dessas culturas com o anticorpo contra p30, específico para este estágio infectivo. Alguns autores consideram que, após a infecção com bradizoítos da cepa ME49, alguns desses parasitos formam cistos teciduais diretamente, sem conversão transitória para taquizoítos, enquanto outros se diferenciam em taquizoítos, antes de formar cistos (Gross e Pohl, 1996; Sahm e cols., 1997; Guimarães e cols., 2008). Vacúolos positivos para marcação com o anticorpo contra p30 e cistos foram visualizados simultaneamente no interior de uma única célula muscular (Guimarães e cols., 2008), como também demonstrado com células epiteliais no presente trabalho. Estes resultados corroboram os estudos de Paredes-Santos e cols. (2013) que sugerem a cistogênese e o estabelecimento do ciclo lítico como eventos assíncronos.

Após 13 dias de cultivo, células CRFK infectadas com *T. gondii* apresentaram má preservação estrutural quando analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, com a presença de células vacuolizadas e de citoplasma escasso. Em contrapartida, algumas dessas células continham cistos que apresentaram ótima preservação ultraestrutural, indicando boa viabilidade celular dos parasitos no seu interior. Estes achados sugeriram que os cistos pudessem ser liberados por células que entraram em processo de morte celular. No 14^o dia após a infecção, cistos bem preservados ultraestruturalmente foram observados no sobrenadante das células infectadas. Estes resultados, portanto, corroboram os de Weiss e cols. (1995), ao identificarem estruturas císticas livres no sobrenadante de culturas de fibroblastos humanos infectadas, sugerindo que essas células possam estar morrendo e liberando os cistos ainda viáveis para o sobrenadante das culturas.

Os dados mostram que as células Vero e CRFK têm potencial para produção de cistos (Resultados complementares e Artigo 1). Introduzir

estratégias experimentais que potencializem este processo, como manobras químicas e/ou físicas, alteração do pH ácido (6.6 – 6.8) ou básico (8 – 8.2), o uso de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ ou privação de nutrientes, dentre outras variáveis (revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008), abre campo na área de biotecnologia objetivando a obtenção de cistos em larga escala, com menor custo e redução no número de animais.

A padronização de técnicas visando a obtenção e a purificação de cistos oriundos de cultura de células deverá ser explorada, como por exemplo, o método desenvolvido por Zhang e cols. (2010) utilizando a lectina DBA acoplada a esferas magnéticas, com potencial de aplicação nos sistemas *in vivo* e *in vitro*. Algumas variáveis como, tamanho dos cistos, períodos para obtenção dos cistos e a quantidade de bradizoítos isolados deverão ser considerados. Para validação desses métodos, ensaios biológicos em animais experimentais, para teste de infectividade de cistos e bradizoítos deverão ser também incorporados a esses estudos. Recentemente, Watts e cols. (2015) aperfeiçoaram técnicas de obtenção de cistos *in vivo*, através do refinamento da técnica de purificação de cistos desenvolvida por Cornelissen e cols. (1981).

O emprego destas metodologias é uma excelente perspectiva para isolar cistos purificados produzidos em culturas. Portanto, as células CRFK e Vero representam bons modelos para produção de cistos e bradizoítos de *T. gondii* em larga escala, através manobras químicas e/ou físicas para maior indução da cistogênese *in vitro*. Estes modelos poderão, gradativamente, contribuir para substituição e redução de animais experimentais como fontes do parasito, atendendo ao princípio humanitário da experimentação animal, conhecido como o princípio dos 3Rs de sustentabilidade (*replacement* = substituição, *reduction* = redução, *refinement* = aprimoramento) no que diz respeito ao uso de animais em pesquisa (Russel e Burch, 1959).

O entendimento dos fatores de indução da cistogênese em células epiteliais *in vitro* se constitui num capítulo à parte nos estudos da interação *T. gondii*-célula hospedeira. Muito embora existam evidências contundentes da contribuição do ambiente bioquímico dos diferentes tipos celulares para o estabelecimento da cistogênese, agregado ainda ao estado funcional das células diferenciadas, há de se considerar que potencialmente, células epiteliais estejam envolvidas neste

processo *in vivo*, como fontes adicionais de produção de cistos e a persistência do parasitismo no hospedeiro.

Além disso, a utilização da linhagem CRFK pode contribuir para a melhor compreensão da biologia celular da interação e, em condições controladas, abrir frentes na investigação de aspectos moleculares envolvidos no epitélio de felinos durante a diferenciação do parasito no seu hospedeiro definitivo.

Uma das dificuldades encontradas para a caracterização e aprofundamento dos estudos da interação do *T. gondii* com seus hospedeiros definitivos, em relação ao ciclo sexuado *in vivo*, se deve à necessidade da utilização de gatos jovens para fins experimentais. Existe pouca informação a respeito dos genes e proteínas específicas associadas ao desenvolvimento dos estágios coccídeos. Behnke e cols. (2014) mostraram o perfil de expressão gênica de merozoítos isolados de intestino de gatos *in vivo* e observaram que genes envolvidos em diferentes vias metabólicas foram mais expressos nos merozoítos, destacando necessidades de crescimento específicos deste estágio. Recentemente, Hehl e cols. (2015) descreveram o perfil transcricional comparativo entre taquizoítos e merozoítos purificados de intestino de gatos e observaram genes que codificam para 177 proteínas secretadas e 64 proteínas associadas à membrana específicas de merozoítos. A maioria dos genes que codificam para proteínas já descritas de grânulos densos (GRA), micronemas (MIC), e róptrias (ROP) não foram expressos em merozoítos. Em contrapartida, grande conjunto de genes para proteínas de superfície (SRS) foi expresso exclusivamente em merozoítos. Os perfis de expressão distintos de merozoítos e taquizoítos revelam alta complexidade dentro do ciclo de vida do *T. gondii*, demonstrando que merozoítos são estágios assexuados distintos adaptados ao seu nicho e propósito biológico, que é a gametogênese.

As alterações na expressão gênica devem estar correlacionadas com diferenciação desses coccídeos no intestino de felinos e, para tal, o desenvolvimento de um sistema *in vitro* possibilitaria um grande avanço nesse campo da pesquisa. Um dos fatores limitantes dos estudos *in vitro* é a ausência de células epiteliais intestinais de felinos comercialmente disponíveis. Dessa forma, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para obtenção de cultura primária de epitélio intestinal de felinos (CEIF), realizada previamente por Moura e cols. (2009), conduziu a novas perspectivas no estudo do ciclo

enteroepitelial do *T. gondii* e abriu um leque de possibilidades para novas estratégias experimentais tanto para a caracterização desse tipo celular, quanto na sua interação com diversos enteropatógenos *in vitro*.

As culturas de CEIF foram obtidas a partir de intestinos de fetos de felinos e as células cultivadas por até 15 dias, como mostrado no Artigo 2 desta tese. As culturas apresentaram boa viabilidade celular e mantiveram sua capacidade proliferativa, bem como suas características morfológicas e funcionais. O sucesso do cultivo das CEIF foi dependente de diversos fatores: primeiramente, o uso de tecido de origem fetal foi essencial para obtenção de células com alta capacidade de adesão ao substrato e proliferação em cultura, como descrito por Siddiqui e Chopra (1984) e Quaroni e Beaulieu (1997); segundo, a dissociação do tecido epitelial com uma solução não enzimática permitiu a obtenção de células com a viabilidade preservada e fragmentos menores que formaram explantes capazes de contribuir para o crescimento e proliferação das CEIF; terceiro, a atividade sinérgica de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF), que também favoreceu o crescimento e proliferação das células em cultura mantendo suas características originais do tecido (Kedinger e cols., 1987; Desmarests e cols., 2013).

A caracterização das CEIF, nas nossas condições de cultivo, mostrou uma população de células epiteliais homogênea com citoplasma abundante, núcleo central e crescimento em ilhotas de células poligonais e em monocamadas, como descrito previamente, por Baten e cols. (1992) e Quaroni (1985). Além disso, por meio das análises ultraestruturais, foram visualizadas junções intercelulares no nosso modelo de cultivo de enterócitos, com a presença de junções do tipo zônula oclusiva, zônula aderentes e desmossomos. As junções intercelulares são os principais pré-requisitos para a integridade e polarização do epitélio intestinal (Laukoetter e cols., 2008). Junções oclusivas são estruturas circunferenciais semelhantes a cinturões que formam uma barreira desde a extremidade apical da célula até o espaço intercelular. Junções aderentes localizam-se imediatamente abaixo das junções oclusivas e desempenham importante função no reconhecimento célula-célula mediando as associações intercelulares. Já os desmossomos, localizados abaixo das junções aderentes, são junções intercelulares pontuais, presentes em epitélios estratificados, como a epiderme, e promovem forte associação intercelular

(Kottke e cols., 2006). O principal constituinte das junções aderentes é a E-caderina, molécula de adesão que forma interações célula-célula e intracelularmente se liga a cateninas, que conecta a E-caderina aos filamentos de actina do citoesqueleto da célula (Halbleib e Nelson, 2006). A E-caderina desenvolve funções importantes na morfogênese do tecido intestinal e é essencial para o desenvolvimento embrionário e a perda de sua função no intestino tem sido correlacionada a processos patológicos (Gassler e cols., 2001). A presença das junções oclusiva, aderente e desmossomos, observadas por MET e a expressão de RNA mensageiro para E-caderina, observada por RT-PCR (dados não mostrados), no nosso modelo certificou a viabilidade e a preservação das estruturas dos enterócitos de felino em cultura.

Citoqueratinas são os componentes principais da rede de filamentos intermediários de células epiteliais e constituem uma classe heterogênea de aproximadamente 30 polipeptídeos estruturalmente descritos (Moll e cols., 1982). Nossas culturas foram positivas para citoqueratina e a detecção foi independente do estágio de diferenciação celular, como proposto por Baten e cols. (1992). A maioria das células nas culturas expressou citoqueratina por 2 semanas e não adquiriram características de outros tipos celulares, demonstrando assim, sua natureza epitelial de acordo com Macartney e cols. (2000). Em contraste, vimentina (expressa em vários tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, precursoras neuronais, células dos tecidos conjuntivo e cartilaginoso) (revisto em Satelli e Li, 2011) e desmina (específico de células musculares), foram detectadas em menos de 5% das células obtidas antes do plaqueamento. Além disso, as CEIF foram capazes de expressar fosfatase alcalina, um marcador intestinal, que persistiu durante todo período de cultivo celular, com progressivo aumento da sua expressão até o 9º dia, em consonância com a descrição de Sanderson e cols. (1996), visto com 6 dias por Follmann e cols. (2000) e com 7 dias por Quinlan e cols. (2006).

As culturas celulares epiteliais intestinais são mais comumente cultivadas em suportes 2D, como na presente tese. Diversas técnicas de cultivo celular têm sido introduzidas na busca de um modelo que mimetize as atividades fisiológicas do tecido intestinal e algumas dessas técnicas deverão ser testadas no nosso sistema. A utilização de suportes permeáveis com membranas microporosas tornou-se um excelente método para a cultura dessas células, uma vez que

facilitam sua polarização e permitem a absorção e secreção de moléculas tanto na superfície basal quanto apical (Moon e cols., 2014). Modelos 3D para o cultivo de células epiteliais tem sido cada vez mais utilizados, por constituir uma ferramenta robusta no campo do desenvolvimento de drogas com potencial para substituir os modelos de cultura celular 2D tradicionais e modelos animais *in vivo* (Pereira e cols., 2015). O sucesso recente na identificação e isolamento de células-tronco epiteliais intestinais humanas (Lgr5 +) a partir do intestino delgado e cólon possibilitaram a realização de culturas de unidades epiteliais intestinais funcionais denominadas organoides. Organoides intestinais são compostos de todos os quatro tipos de células epiteliais normais e são capazes de desenvolver o eixo de diferenciação desde as criptas até as vilosidades intestinais. Este modelo de cultivo celular tem sido capaz de executar algumas das principais funções fisiológicas do intestino, incluindo absorção de Na⁺ e secreção de Cl⁻ (revisto por Foulke-Abel e cols., 2014). Assim, cultivos 3D ou o desenvolvimento de organoides se mostram como boas perspectivas para o desenvolvimento das culturas intestinais de felinos que reproduzam as características fisiológicas e moleculares do tecido intestinal para seu monitoramento em condições normais e durante a infecção pelo *T. gondii*, uma das principais metas e diferencial deste trabalho.

Uma outra estratégia experimental bastante promissora é o emprego da técnica de imortalização de células epiteliais por transfecção de plasmídeos que carregam o gene hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) em conjunto com oncogenes virais, já utilizadas em diversos tipos celulares epiteliais (Lundberg et al., 2002; Zabner et al., 2003; Piao et al., 2005; Yip e cols., 2013; Garbe e cols., 2014; Wang e cols., 2014). A imortalização da CEIF será realizada, uma vez que ainda não existe linhagem intestinal de felinos disponível comercialmente para a utilização na pesquisa. As células imortalizadas deverão ser caracterizadas para verificação da manutenção da identidade e das propriedades epiteliais intestinais.

A utilização da CEIF como modelo de estudo durante a interação com o *T. gondii* permitiu monitorar a cinética da infecção e explorar novos aspectos desta interação. A utilização de estágios bradizoítos como fonte de infecção, como supracitado, se justifica por representar a via natural de transmissão para os felídeos (através do consume da carne de suas principais presas). Além disso,

Ferguson (2004) mostrou em um diagrama esquemático todas as possibilidades de desenvolvimento e diferenciação entre os estágios de *T. gondii* durante seu ciclo de vida e o único estágio infectivo capaz de se converter diretamente para merozoítos são os bradizoítos. Estes dados reforçam a adequação da escolha de bradizoítos como fonte de infecção para CEIF e permitiu a diferenciação de bradizoítos em merozoítos *in vitro*.

A influência da carga parasitária também foi decisiva para o desenvolvimento e diferenciação do parasito durante a interação *T. gondii*-CEIF. Infectando os enterócitos com bradizoítos da cepa ME49, na relação 1:5 parasito-célula hospedeira foi observada a conversão de bradizoítos em taquizoítos em 48 h pós infecção, através da detecção de SAG-1 em mais de 95% das formas parasitárias intracelulares, semelhante aos resultados da análise de intestino de gatos infectados obtidos por Dubey (1997b). A estágio conversão de bradizoítos para taquizoítos é um processo natural que ocorre nas primeiras 15 h de infecção em culturas, sem a adição de substâncias imunomoduladoras (Gross e cols., 1996). A partir de 96 h de infecção foram observados muitos parasitos no meio extracelular e lise das CEIF, caracterizando o ciclo lítico do *T. gondii*, ratificando os resultados obtidos por Dzierszynski e cols. (2004) que observaram lise celular de 72 a 96 h pós infecção em linhagens celulares de diferentes origens.

O estabelecimento da cistogênese espontânea, com a formação de cistos intracelulares, em células de cultura primária de CEIF foi observado a partir de 72 h de infecção quando a carga de 1:10 (parasito:célula hospedeira) foi utilizada, corroborando os resultados obtidos pelo nosso grupo com as células CRFK. Células hospedeiras com ciclo celular quiescente, ou seja, em G0 (como as células musculares esqueléticas - CME) representam um microambiente de predileção para a diferenciação e formação de cistos, como proposto por Swierzy e Lüder (2015). Além disso, Guimarães e cols. (2008), Ferreira-da Silva e cols. (2009) e Takacs e cols. (2012) sugerem que fatores inerentes ao tipo celular possam promover a estágio diferenciação do *T. gondii*, sem a necessidade da utilização de fatores indutores de estresse. Esses dados, em associação à diferenciação de CEIF em cultura, reforçam o conceito mais atual de que a cistogênese *in vitro* é dependente de diversos fatores, incluindo a cepa do parasito, a carga parasitária e o tipo celular (ou a interação de todos esses

fatores) em conjunto com o estágio metabólico ou de diferenciação da célula hospedeira.

As condições experimentais realizadas neste trabalho possibilitaram, pelo menos em parte, a obtenção de estágios esquizontes de *T. gondii* com características morfológicas muito semelhantes às observadas nos sistemas *in vivo* (Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005). Worliczek e cols. (2013) identificaram influências significativas da carga parasitária no processo de diferenciação de merozoítos de *Isospora suis* em células epiteliais intestinais de suínos *in vitro*. Os autores observaram alta densidade de merozoítos em cultura quando a carga de 1 parasito:10 células hospedeiras foi utilizada e ao diminuir a carga para 1:100 ou 1:200 obtiveram índices mais altos de oocistos produzidos nessas culturas. Estes resultados corroboram os nossos, uma vez que observamos que a carga parasitária foi decisiva no processo da cistogênese *in vitro* e para a diferenciação de bradizoítos em esquizontes nos enterócitos de felinos. A relação parasito:célula de 1:20 mostrou que baixas doses infectivas parecem ser mais efetivas na produção de esquizontes *in vitro*. Esta constatação corresponde à reprodutibilidade do processo *in vivo*, considerando-se que a infecção na natureza, através do consumo de carne, não apresenta carga elevada de parasitos.

Culturas infectadas com *T. gondii*, processadas para microscopia óptica e coradas com Giemsa apontaram para diferenciação do parasito após 48 h de interação. Estruturas muito semelhantes aos esquizontes dos tipos B e C foram visualizadas nesse tempo, corroborando as imagens descritas por Speer e Dubey (2005) em cortes histológicos de intestino delgado de felinos, após 42 h da infecção oral com cistos. Imagens inéditas obtidas a partir de 48 h de interação bradizoítos e CEIF mostraram vacúolos contendo grandes massas multinucleadas sugerindo o processo de geração de merozoítos do tipo B que ao iniciarem a diferenciação para esquizontes do tipo C, permanecem no mesmo VP formando essas estruturas típicas, em concordância com a descrição de Speer e Dubey (2005) como pode ser visualizado na Figura 2. Ainda, a análise por microscopia óptica demonstrou a diferenciação em esquizontes tipo C a partir de 72 h de infecção. As imagens, mostram parasitos periféricamente dispostos no interior do vacúolo, alguns distribuídos ao redor de corpos residuais, com grande similaridade aos parasitos observados em cortes histológicos de intestino

de gatos infectados descritos por Ferguson (2004) e por Speer e Dubey (2005), como pode ser comparado na Figura 3. Ferguson (2004) utilizou uma gama de marcadores moleculares e análises ultraestruturais para caracterizar os estágios infectivos do *T. gondii*, dentre eles os merozoítos. Infelizmente, a grande maioria desses marcadores não se encontra disponível comercialmente, o que restringe nossas análises à caracterização morfológica por microscopias de luz e eletrônica de transmissão.

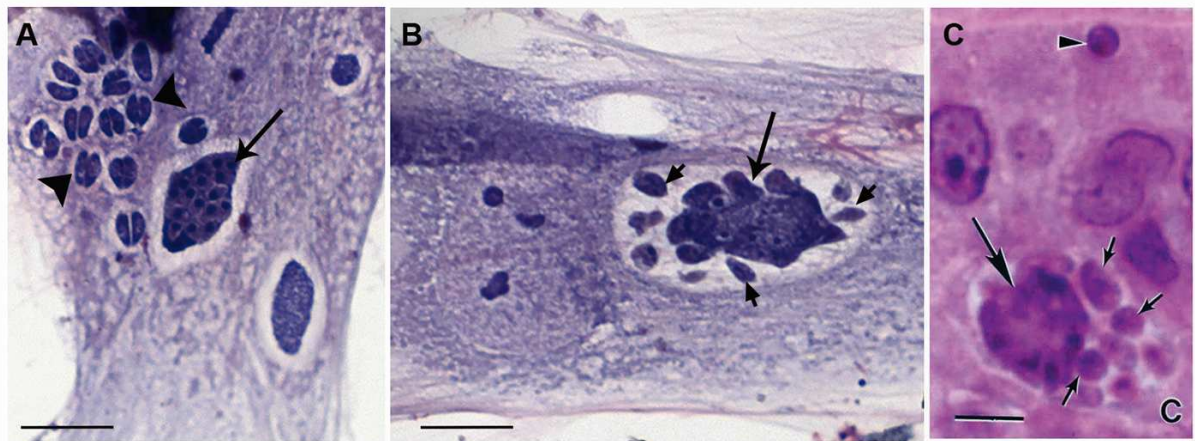


Figura 2: Formas semelhantes a esquizontes em CEIF após 48 h de infecção com bradizoítos de *T. gondii* versus esquizonte do tipo B descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). (A) massa multinucleada (setas) observada ao lado de parasitos em dupla (cabeças de seta); (B) massas multinucleadas (setas grandes) com corpos citoplasmáticos ao redor (setas pequenas); (C) Esquizonte tipo B descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). Barras = 10 μm

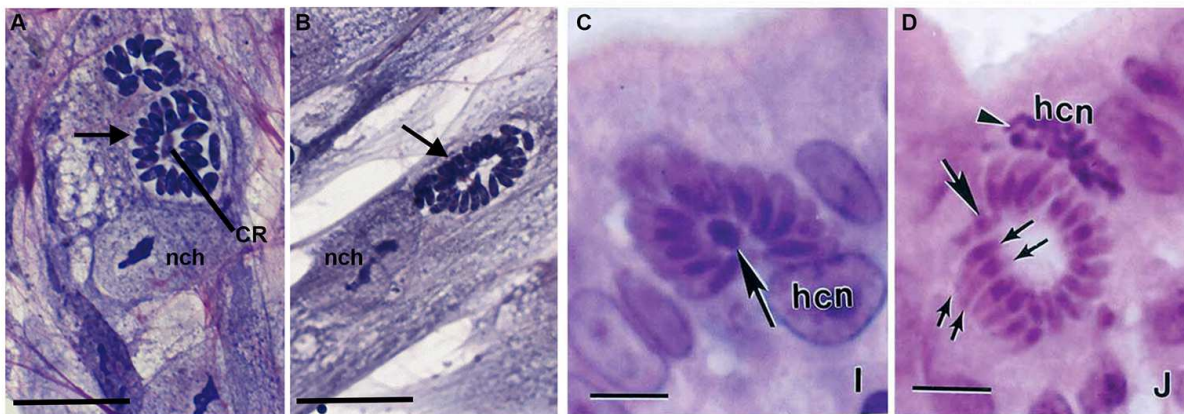


Figura 3: Formas semelhantes a esquizontes em CEIF após 72 h de infecção com bradizoítos de *T. gondii* versus esquizonte do tipo C descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). (A) VP com parasitos organizados periféricamente (seta) ao redor de um corpo residual evidente (CR) próximo ao núcleo da célula hospedeira (nch) muito semelhante à figura C; (B) VP com diversos parasitos em arranjo periférico (seta) muito próximo ao núcleo da célula hospedeira (nch), semelhante à figura D; (C-D) Esquizontes tipo C descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). Barras = 10 μ m

Estudos clássicos de Jones e cols. (1972) descrevem que em macrófagos, somente vacúolos contendo *T. gondii* viáveis são circundados por mitocôndrias e retículo endoplasmático (RE) (revisto em Sinai e cols., 1997 e em De Souza, 2005). O papel funcional dessas associações, tão logo o parasito esteja albergado no VP, em particular do RE e inclusões lipídicas, parece estar vinculado a necessidade de aumento da área da membrana do VP durante o processo de multiplicação do parasito (de Melo e de Souza, 1997; Sinai e cols., 1997; Magno e cols., 2005; Gomes e cols., 2014). Goldszmid e cols. (2009) observaram por imunocitoquímica ultraestrutural a transferência de componentes de RE para o interior do VP, indicando que ocorre a fusão entre os dois compartimentos. Esses dados sugerem que componentes do RE possam ser incorporados pelos parasitos intracelulares, constituindo uma fonte de nutrientes e lipídios, possivelmente, para seu desenvolvimento, como proposto anteriormente (De Melo e cols., 1992, De Melo e de Souza 1997; Charron e Sibley, 2002; Goldszmid e cols., 2009; Gomes e cols., 2014). Por outro lado, a

proteína ROP2 tem sido observada incorporada à membrana do VP e seu domínio terminal NH₂ exposto para o citoplasma da célula hospedeira. Esse domínio possui características de sinais alvo mitocondriais, favorecendo a associação da mitocôndria ao VP (Sinai e Joiner, 2001). As mitocôndrias de células infectadas também foram visualizadas ao redor de cistos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Sahm e cols., 1997; Sims e cols., 1989a), o que poderia favorecer a circulação de nutrientes para os parasitos intracísticos (bradizoítos), o que garantiria sua sobrevivência por longos períodos no hospedeiro. Além dessa relação íntima de organelas da célula hospedeira com a membrana do VP (MVP), o *T. gondii* ainda é capaz de alterar a permeabilidade da MVP. O aumento da permeabilidade da MVP permite a difusão de moléculas pequenas como, açúcares, aminoácidos e co-fatores do citoplasma da célula hospedeira para o interior do VP (Schwab e cols., 1994). Mais recentemente, Romano e cols. (2013) descreveram que vacúolos contendo toxoplasmas ancoram vesículas marcadas com as proteínas do tipo Rab oriundas do complexo de Golgi para captação de esfingolipídeos. No nosso modelo, as análises ultraestruturais de CEIF durante o desenvolvimento de esquizontes revelaram a presença constante de organelas da célula hospedeira, como retículo endoplasmático e mitocôndrias, associadas aos VP, bem como Golgi o que poderia auxiliar na alta atividade metabólica desses parasitos durante a esquizogonia.

Nosso grupo tem acumulado fortes evidências do estabelecimento da esquizogônia no nosso modelo celular, a partir da observação de grande massa citoplasmática com 3 ou mais núcleos, grandes mitocôndrias, grânulos densos, alguns grânulos de amilopectina e grandes corpúsculos lipídicos no interior do VP. Essas características foram descritas em esquizontes do tipo D durante o processo de divisão por endopoligenia (Speer e Dubey, 2005), como pode ser comparado nas imagens da Figura 4. Esse processo de divisão celular parece ser observado exclusivamente com *T. gondii* (Ferguson, 2009). Desta forma, a evidência desses vacúolos grandes, contendo formas multiplicativas desorganizadas, característico do processo por endopoligenia, nas CEIF, a partir da infecção com bradizoítos, fortemente sugerem que possam representar estágios precursores da gametogênese, como por exemplo, o esquizonte tipo E, como proposto nos estudos de Speer e Dubey (2005). Se a semelhança estrutural dessas massas multinucleadas, representa de fato o processo de

endopoligenia de merozoítos, como verificado neste estudo, esta será a primeira vez que, pelo menos parte do ciclo enteroepitelial do *T. gondii* está sendo reproduzido *in vitro*.



Figura 4: Formas semelhantes a esquizontes em CEIF após 6 dias de infecção com bradizoítos de *T. gondii* versus esquizonte do tipo D descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). (A) merozoítos com grandes inclusões lipídicas (Li) unidos ainda por um corpo residual (Rb), contendo organelas como: grânulos densos (Dg), lipídios (Li), mitocôndrias (Mi) e núcleos bem desenvolvido (Nu); (B) Esquizontes tipo D descrito *in vivo*, por Speer e Dubey (2005). Barras = 1 µm

O conjunto de estratégias experimentais aplicadas na presente tese teve como principal objetivo a reprodução *in vitro* do desenvolvimento do *T. gondii* nas células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo, o gato doméstico. A introdução de culturas primárias de células epiteliais intestinais de felinos neste estudo mostrou que potencialmente pode contribuir com novos subsídios, não apenas para o entendimento da biologia celular do parasito, mas também para a melhor compreensão do ciclo entérico do *T. gondii* em condições controladas. A reprodução da toxoplasmose felina experimental *in vitro*, permite explorar os aspectos moleculares desta interação, como por exemplo, a modulação de

genes e proteínas como proposto por Ferguson (2009). Adicionalmente, abre perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias para obtenção de estágios infectivos de *T. gondii* de modelos celulares *in vitro*, bem como em medidas para intervenção em uma das principais rotas de disseminação da toxoplasmose, a contaminação ambiental com oocistos, que em particular no Brasil, apresenta grande importância como via de transmissão do parasito.

CONCLUSÕES

- Células epiteliais renais de origem felina (CRFK) são mais susceptíveis à infecção por bradizoítos de *T. gondii* corroborando as evidências de que a origem do hospedeiro determina a interação do parasito com a célula hospedeira;
- As linhagens CRFK e Vero são bons modelos para o estudo da cistogênese *in vitro* e com potencial para aplicação em biotecnologia para o estabelecimento de protocolos que permitam a obtenção de parasitos em larga escala;
- Culturas primárias de células epiteliais intestinais de felinos (CEIF) mantêm suas características morfológicas e funcionais *in vitro* com potencial para imortalização e são aplicáveis para o estudo do ciclo entérico do *T. gondii in vitro*;
- A obtenção pioneira de estágios infectivos correspondentes morfológicamente a esquizontes de *T. gondii* detectados nas CEIF são indicativos da reprodutibilidade do ciclo coccídeo do parasito nos enterócitos de felinos se constituindo de uma nova ferramenta metodológica.

REFERÊNCIAS

- Ahnen DJ, Reed TA, Bozdech JM. Isolation and characterization of populations of mature and immature rat colonocytes. *Am J Physiol*. 1988 Apr;254(Pt 1):610-21.
- Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D e cols. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2002 Sep 1;186(5):684-9.
- Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J e cols. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2009 Apr 15;199(8):1155-67.
- Ajzenberg D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiol*. 2010 Jun;5(6):841-3.
- Alaganan A, Fentress SJ, Tang K, Wang Q, Sibley LD. *Toxoplasma* GRA7 effector increases turnover of immunity-related GTPases and contributes to acute virulence in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 21;111(3):1126-31.
- Aldhous MC, Shmakov AN, Bode J, Ghosh S. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2001 Jul;125(1):32-40.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog*. 2005 Oct;1(2):e17.
- Allison AC, Gregoriadis G. Vaccines: recent trends and progress. *Immunol Today*. 1990 Dec;11(12):427-9.
- Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol*. 2008 Nov;Appendix 4:Appendix 4E.
- Anantharaman V, Iyer LM, Balaji S, Aravind L. Adhesion molecules and other secreted host-interaction determinants in Apicomplexa: insights from comparative genomics. *Int Rev Cytol*. 2007;262:1-74.
- Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. Small intestinal submucosa: a substrate for *in vitro* cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9:863-78.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jan;9(1):55-62.
- Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Arch Ophthalmol*. 2010 Jan;128(1):28-32.

- Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 2011 Dec 15;45(20):6603-14.
- Balls M. Animal experimentation and the Three Rs: the need for hard heads and soft hearts and to confront the Three "I"s. *Altern Lab Anim.* 2007 Dec;35(6):547-8.
- Bartsch I, Zschaler I, Haseloff M, Steinberg P. Establishment of a long-term culture system for rat colon epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2004 Sep-Oct;40(8-9):278-84.
- Baten A, Sakamoto K, Shamsuddin AM. Long-term culture of normal human colonic epithelial cells *in vitro*. *FASEB J.* 1992 Jun;6(9):2726-34. Erratum in: *FASEB J* 1992 Dec;6(15):3409.
- Behnke MS, Radke JB, Smith AT, Sullivan WJ Jr, White MW. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol Microbiol.* 2008 Jun;68(6):1502-18.
- Behnke MS, Zhang TP, Dubey JP, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* merozoite gene expression analysis with comparison to the life cycle discloses a unique expression state during enteric development. *BMC Genomics.* 2014 May 8;15:350.
- Belli SI, Smith NC, Ferguson DJ. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends Parasitol.* 2006 Sep;22(9):416-23.
- Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol.* 2011 Jun;13(6):797-805.
- Birkner S, Weber S, Dohle A, Schmahl G, Föllmann W. Growth and characterisation of primary bovine colon epithelial cells *in vitro*. *Altern Lab Anim.* 2004 Dec;32(6):555-71.
- Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Sep;64(3):607-23.
- Blader IJ, Koshy AA. *Toxoplasma gondii* development of its replicative niche: in its host cell and beyond. *Eukaryot Cell.* 2014 Aug;13(8):965-76.
- Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol.* 2015 Aug 28.
- Bohne W, Gross U, Heesemann J. Differentiation between mouse-virulent and -avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. *J Clin Microbiol.* 1993 Jun;31(6):1641-3.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun.* 1994 May;62(5):1761-7.

- Bohne W, Holpert M, Gross U. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Immunobiology. 1999 Dec;201(2):248-54.
- Booth C, Patel S, Bennion GR, Potten CS. The isolation and culture of adult mouse colonic epithelium. Epithelial Cell Biol. 1995;4(2):76-86.
- Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? Curr Opin Microbiol. 2002 Aug;5(4):438-42.
- Boucher LE, Bosch J. The apicomplexan glideosome and adhesins - Structures and function. J Struct Biol. 2015 May;190(2):93-114.
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. Lancet. 1997 Jul 19;350(9072):173-7.
- Browning KN, Lees GM. Reappraisal of the innervation of rat intestine by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y-immunoreactive neurons. Neuroscience. 1994 Oct;62(4):1257-66.
- Caldas LA, de Souza W, Attias M. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. Vet Parasitol. 2010 Jan 20;167(1):8-18.
- Cantin A, Woods DE. Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*. J Clin Invest. 1993 Jan;91(1):38-45.
- Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop. 2002 Feb;81(2):111-22.
- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol. 1997 Jun;73(2):114-23.
- Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop. 2002 Feb;81(2):111-22.
- Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Curr Opin Microbiol. 2007 Feb;10(1):83-9.
- Cesbron-Delauw MF, Guy B, Torpier G, Pierce RJ, Lenzen G, Cesbron JY, Charif H, Lepage P, Darcy F, Lecocq JP, et al. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Oct;86(19):7537-41.
- Chacin-Bonilla L, Sanchez-Chavez Y, Monsalve F, Estevez J. Seroepidemiology of toxoplasmosis in amerindians from western Venezuela. Am J Trop Med Hyg. 2001 Aug;65(2):131-5.

- Chai Z, Sarcevic B, Mawson A, Toh BH. SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):33665-74.
- Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 2002;115:3049-3059.
- Charron AJ, Sibley LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic*. 2004 Nov;5(11):855-67.
- Chatterton JM, McDonagh S, Ho-Yen DO. *Toxoplasma* tachyzoites from cell culture are more appropriate in some situations. *J Clin Pathol*. 2010 May;63(5):438-40.
- Chopra DP, Dombkowski AA, Stemmer PM, Parker GC. Intestinal epithelial cells *in vitro*. *Stem Cells Dev*. 2010 Jan;19(1):131-42.
- Coppens I, Joiner KA. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? *Expert Rev Mol Med*. 2001 Jan 15;2001:1-20.
- Coppens I, Joiner KA. Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell*. 2003;14:3804-3820.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*. 2006 Apr 21;125(2):261-74.
- Cornelissen AW, Overdulve JP, Hoenderboom JM. Separation of *Isospora (Toxoplasma) gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. *Parasitology*. 1981 Aug;83(Pt 1):103-8.
- Crandell RA, Fabricant CG, Nelson-Rees WA. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro*. 1973 Nov-Dec;9(3):176-85.
- Dardé ML, Bouteille B, Leboutet MJ, Loubet A, Pestre-Alexandre M. *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64(6):403-11.
- de Lima LP, Seabra SH, Carneiro H, Barbosa HS. Effect of 3-Bromopyruvate and Atovaquone on Infection during *In Vitro* Interaction of *Toxoplasma gondii* and LLC-MK2 Cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5239-49.
- De Melo EJ, de Carvalho TU, de Souza W. Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct*. 1992;17:311-317.
- De Melo EJT, De Souza WM. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 1997;83:252-256.
- de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM, da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett

- DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis.* 2006 Feb;12(2):326-9.
- de Souza W, Souto-Pradón T. Ultrastructural localization of basic proteins on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Z Parasitenkd.* 1978 Jul 4;56(2):123-9.
- de Souza W. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.* 2005 Jan;123(1):1-18.
- de Souza, W, Rubens Belfort (ED.). *Toxoplasmosis e Toxoplasma gondii*. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014.
- Desmarests LM, Theuns S, Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Vermeulen BL, Roukaerts ID, Nauwynck HJ. Establishment of feline intestinal epithelial cell cultures for the propagation and study of feline enteric coronaviruses. *Vet Res.* 2013 Aug 21;44:71.
- Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 1996 Mar 22;84(6):933-9.
- Donahue PR, Hoover EA, Beltz GA, Riedel N, Hirsch VM, Overbaugh J, Mullins JI. Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *J Virol.* 1988 Mar;62(3):722-31.
- Drewry LL, Sibley LD. *Toxoplasma* Actin Is Required for Efficient Host Cell Invasion. *MBio.* 2015 Jun 16;6(3):e00557.
- Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol.* 1997a Nov-Dec;44(6):592-602. Erratum in: *J Eukaryot Microbiol* 1998 May-Jun;45(3):367.
- Dubey JP. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 1997b Aug;83(4):755-7.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998a Jul;28(7):1019-24.
- Dubey JP. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol.* 2001 Feb;87(1):215-9.
- Dubey JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J Parasitol.* 2002 Aug;88(4):713-7.
- Dubey JP. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: *in vivo* stage conversion and strain variation. *Vet Parasitol.* 2005 Nov 5;133(4):289-98.

- Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet Parasitol.* 2006 Aug 31;140(1-2):69-75.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008 Nov-Dec;55(6):467-75.
- Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2009 Jul 1;39(8):877-82.
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1970 Dec 1;157(11):1767-70.
- Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972 Feb;19(1):155-77.
- Dubey JP, Frenkel JK. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol.* 1973 Jun;59(3):505-12.
- Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976 Nov;23(4):537-46.
- Dubey JP, Welcome FL. *Toxoplasma gondii*-induced abortion in sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 1988 Sep 15;193(6):697-700.
- Dubey JP, Carpenter JL. Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1993 Dec 1;203(11):1546-9.
- 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 Apr;11(2):267-99.
- Dubey JP, Frenkel JK. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol.* 1998 May;77(1):1-32.
- Dubey JP, Saville WJ, Stanek JF, Reed SM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *J Parasitol.* 2002 Aug;88(4):802-3.
- Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH e cols. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol.* 2004 Aug;90(4):721-6.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012 Sep;139(11):1375-424.
- Dumètre A, Aubert D, Puech PH, Hohweyer J, Azas N, Villena I. Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Feb;78(4):905-12.

- Dumètre A, Dubey JP, Ferguson DJ, Bongrand P, Azas N, Puech PH. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jul 9;110(28):11535-40.
- Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. Eukaryot Cell. 2004 Aug;3(4):992-1003.
- Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol. 2010 Apr;26(4):190-6.
- Evans GS, Flint N, Potten CS. Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium. Annu Rev Physiol. 1994;56:399-417.
- Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. Int J Parasitol. 2004 Mar 9;34(3):347-60.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Mar;104(2):133-48.
- Ferguson DJ, Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1974 Apr;82(2):167-81.
- Ferguson DJ, Hutchison WM, Siim JC. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol Microbiol Scand B. 1975 Oct;83(5):491-505.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol Res. 1987;73(6):483-91.
- Ferguson DJ, Sahoo N, Pinches RA, Bumstead JM, Tomley FM, Gubbels MJ. MORN1 has a conserved role in asexual and sexual development across the apicomplexa. Eukaryot Cell. 2008 Apr;7(4):698-711.
- Ferreira da Silva Mda F, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. Mol Biosyst. 2008 Aug;4(8):824-34.
- Ferreira-da-Silva Mda F, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho Ld, Gross U, Lüder CG, Barbosa HS. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009a Mar;104(2):196-200.
- Ferreira-da-Silva Mda F, Takács AC, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-

- bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int J Med Microbiol.* 2009b Jun;299(5):381-8.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Jul;59(1):221-6.
- Follmann W, Weber S, Birkner S. Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicol In Vitro.* 2000 Oct;14(5):435-45.
- Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Ettayebi K, Blutt SE, Hyser JM, Zeng XL, Crawford SE, Broughman JR, Estes MK, Donowitz M. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014 Sep;239(9):1124-34.
- Fouts AE, Boothroyd JC. Infection with *Toxoplasma gondii* bradyzoites has a diminished impact on host transcript levels relative to tachyzoite infection. *Infect Immun.* 2007 Feb;75(2):634-42. Epub 2006 Nov 6. Erratum in: *Infect Immun.* 2007 Jun;75(6):3209.
- 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 Mar 9;34(3):323-31.
- Frénal K, Soldati-Favre D. Plasticity and Redundancy in Proteins Important for *Toxoplasma* Invasion. *PLoS Pathog.* 2015 Aug 13;11(8):e1005069.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970 Feb 6;167(3919):893-6.
- Frenkel JK, Dubey JP. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis.* 1972 Dec;126(6):664-73.
- 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.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001 Apr;39(4):1566-70.
- Fukamachi H. Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J Cell Sci.* 1992 Oct;103 (Pt2):511-9.
- Garbe JC, Vrba L, Sputova K, Fuchs L, Novak P, Brothman AR, Jackson M, Chin K, LaBarge MA, Watts G, Futscher BW, Stampfer MR. Immortalization of normal human mammary epithelial cells in two steps by direct targeting of senescence barriers does not require gross genomic alterations. *Cell Cycle.* 2014;13(21):3423-35.

- Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N e cols. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jul;281(1):G216-28.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1994;153:2533-2543.
- Golaz JL, Vonlaufen N, Hemphill A, Burgener IA. Establishment and characterization of a primary canine duodenal epithelial cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007 May-Jun;43(5-6):176-85.
- Goldszmid RS, Coppens I, Lev A, Caspar P, Mellman I, Sher A. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med.* 2009;206:399-410.
- Gomes AF, Magalhães KG, Rodrigues RM, de Carvalho L, Molinaro R, Bozza PT, Barbosa HS. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2. *Parasit Vectors.* 2014 Jan 23;7:47.
- Gross U, Bohne W. *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. *J Eukaryot Microbiol.* 1994 Sep-Oct;41(5):10S-11S.
- Gross U, Bohne W, Soète M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today.* 1996 Jan;12(1):30-3
- Gross U, Pohl F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;219:235-45.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. An alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Oct;98(7):915-7.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J Parasitol.* 2008 Feb;94(1):72-83.
- Guimarães EV, Carvalho Ld, Barbosa HS. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Mar;104(2):170-4.
- Haapala DK, Robey WG, Oroszlan SD, Tsai WP. Isolation from cats of a novel endogenous type C virus with a novel envelope glycoprotein. *J Virol.* 1985 Mar;53(3):827-33.
- Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 2006 Dec 1;20(23):3199-214.

- Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Nov;55(11):1150-6.
- Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013;114:125-45.
- Hehl AB, Basso WU, Lippuner C, Ramakrishnan C, Okoniewski M, Walker RA e cols. Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. *BMC Genomics*. 2015 Feb 13;16:66.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002 Oct;8(10):634-40.
- Hill DE, Haley C, Wagner B, Gamble HR, Dubey JP. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). *Zoonoses Public Health*. 2010 Feb;57(1):53-9.
- Hoff RL, Dubey JP, Behbehani AM, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. *J Parasitol*. 1977 Dec;63(6):1121-4.
- Hogan M.J., Yoneda C., Fee ney L., Zwe igart P., Lew is A. Morphology and culture of *Toxoplasma*. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1960;58:167-87.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995 Dec;172(6):1561-6.
- Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1997 Jun;35(6):1411-4.
- Hsiao CH, Luisa Hiller N, Haldar K, Knoll LJ. A HT/PEXEL motif in *Toxoplasma* dense granule proteins is a signal for protein cleavage but not export into the host cell. *Traffic*. 2013 May;14(5):519-31.
- Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1960 Feb;46:11-21.
- Jacobse-Geels HE, Horzinek MC. Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *J Gen Virol*. 1983 Sep;64 (Pt 9):1859-66.
- Jones TC, Yeh S, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med*. 1972 Nov 1;136(5):1157-72.
- Jones TC, Bienz KA, Erb P. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect Immun*. 1986 Jan;51(1):147-56.

- Jones J, Lopez A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician*. 2003 May 15;67(10):2131-8.
- Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp Parasitol*. 2010 Jan;124(1):10-25.
- Kaushik RS, Begg AA, Wilson HL, Aich P, Abrahamsen MS, Potter A e cols. Establishment of fetal bovine intestinal epithelial cell cultures susceptible to bovine rotavirus infection. *J Virol Methods*. 2008 Mar;148(1-2):182-96.
- Kedinger M, Simon-Assmann P, Haffen K. Growth and differentiation of intestinal endodermal cells in a coculture system. *Gut*. 1987;28 Suppl:237-41.
- Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci*. 2006 Mar 1;119 (Pt 5):797-806.
- Lasfargues EY, Lasfargues JC, Dion AS, Greene AE, Moore DH. Experimental infection of a cat kidney cell line with the mouse mammary tumor virus. *Cancer Res*. 1976 Jan;36(1):67-72.
- Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 21;14(3):401-7.
- Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, Poncet J, Bradley PJ, Vial H, Dubremetz JF. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol*. 2005 Dec;7(12):1823-33.
- Lebrun M *et al*. *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. In: *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan – Perspectives and Methods* 2nd edn; 2013. pp. 390–455.
- Lehmann R, Joller H, Haagmans BL, Lutz H. Tumor necrosis factor alpha levels in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus: effects of immunization and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 1992 Dec;35(1-2):61-9.
- Lehmann R, von Beust B, Niederer E, Condrau MA, Fierz W, Aubert *et al*. Immunization-induced decrease of the CD4+:CD8+ ratio in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol*. 1992 Dec;35(1-2):199-214.
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1976 Dec;36(12):4562-9.
- Leng L, Luo M, Gao J, Shen LJ. Study and application of surface antigen in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*. 2014 Dec;26(6):687-9.

- Lindberg K, Badylak SF. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting *in vitro* primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns*. 2001 May;27(3):254-66.
- Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL, Toivio-Kinnucan M. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol*. 1991 Feb;77(1):126-32.
- Lindsay DS, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J Parasitol*. 1993 Apr;79(2):289-92.
- Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology*. 2011 Dec;138(14):1829-31.
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, Yap GS. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med*. 2006 Sep 4;203(9):2063-71.
- Lundberg A S, S. H. Randell, S. A. Stewart, B. Elenbaas, K. A. Hartwell, M. W. Brooks, M. D. Fleming, J. C. Olsen, S. W. Miller, R. A. Weinberg, and W. C. Hahn. 2002. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* 21(29):4577–86.
- Ma JS, Sasai M, Ohshima J, Lee Y, Bando H, Takeda K, Yamamoto M. Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. *J Exp Med*. 2014 Sep 22;211(10):2013-32.
- Macartney KK, Baumgart DC, Carding SR, Brubaker JO, Offit PA. Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. *J Virol*. 2000 Jun;74(12):5597-603.
- Magno RC, Straker LC, de Souza W, Attias M. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal*. 2005 Apr;11(2):166-74.
- Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, De Souza D, McConville MJ, Wallach MG, Belli SI, Ferguson DJ, Smith NC. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):281-9.
- Manger ID, Hehl A, Parmley S, Sibley LD, Marra M, Hillier L, Waterston R, Boothroyd JC. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1632-7.
- Masatani T, Matsuo T, Tanaka T, Terkawi MA, Lee EG, Goo YK et al. TgGRA23, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the

- parasitophorous vacuole membrane and intravacuolar network. *Parasitol Int.* 2013 Aug;62(4):372-9.
- Matsubayashi H, Akao S. Morphological studies on the development of the *Toxoplasma* cyst. *Am J Trop Med Hyg.* 1963 May;12:321-33.
- McHugh TD, Gbewonyo A, Johnson JD, Holliman RE, Butcher PD. Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Dec 15;114(3):325-32.
- Mehlhorn H, Frenkel JK. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol.* 1980 Feb;66(1):59-67.
- Mercier C, Adjogble KD, Däubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* 2005 Jul;35(8):829-49. Review. Erratum in: *Int J Parasitol.* 2005 Dec;35(14):1611-2.
- Mercier C, Travier L, Bittame A, Gendrin C, Cesbron-Delauw MF. The dense granule proteins of *Toxoplasma gondii*. In *Parasitology Research Trends*. Nova Publishers; 2010. pp. 1–31.
- Mercier C, Cesbron-Delauw MF. Safe living within a parasitophorous vacuole: the recipe of success by *Toxoplasma gondii*. In: *Pathogen Interaction. At the Frontier of Cellular Microbiology*. Ghigo, E., ed.; 2012. pp. 1–18.
- Mercier C, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol.* 2015 Feb;31(2):60-71.
- Miyazawa T, Toyosaki T, Tomonaga K, Norimine J, Ohno K, Hasegawa A, Kai C, Mikami T. Further characterization of a feline T-lymphoblastoid cell line (MYA-1 cells) highly sensitive for feline immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci.* 1992 Feb;54(1):173-5.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008 Aug 15;47(4):554-66.
- Moon C, VanDussen KL, Miyoshi H, Stappenbeck TS. Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal Immunol.* 2014 Jul;7(4):818-28.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* 1995 Jun;108 (Pt 6):2457-64.

- Morrisette N. Targeting *Toxoplasma* tubules: tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot Cell*. 2015 Jan;14(1):2-12.
- Moura MA, Amendoeira MR, Barbosa HS. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Sep;104(6):862-4.
- Naguleswaran A, Elias EV, McClintick J, Edenberg HJ, Sullivan WJ Jr. *Toxoplasma gondii* lysine acetyltransferase GCN5-A functions in the cellular response to alkaline stress and expression of cyst genes. *PLoS Pathog*. 2010 Dec 16;6(12):e1001232.
- Nam HW. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol*. 2009 Oct;47 Suppl:S29-37.
- Nelson-Rees WA, Weaver J, Riggs JL. Chromosomes of two strains of a feline cell line (F 1 B) permanently shedding a C-type virus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972 Jan;139(1):6-9.
- Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte J, Becker D, Tuuminen T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Int J Epidemiol*. 2000 Oct;29(5):941-7.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci*. 1908 147: 736.
- Okada T, Marmansari D, Li ZM, Adilbish A, Canko S, Ueno A, Shono H, Furuoka H, Igarashi M. A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2013 May;189(1-2):5-13.
- Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, Correa D. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun*. 2010 Jul;11(5):363-73.
- Palanisamy M, Madhavan B, Balasundaram MB, Andavar R, Venkatapathy N. Outbreak of ocular toxoplasmosis in Coimbatore, India. *Indian J Ophthalmol*. 2006 Jun;54(2):129-31.
- Paraskeva C, Buckle BG, Sheer D, Wigley CB. The isolation and characterization of colorectal epithelial cell lines at different stages in malignant transformation from familial polyposis coli patients. *Int J Cancer*. 1984 Jul 15;34(1):49-56.
- Paredes-Santos TC, Martins-Duarte ES, Vitor RW, de Souza W, Attias M, Vommaro RC. Spontaneous cystogenesis *in vitro* of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int*. 2013 Apr;62(2):181-8.

- Paredes-Santos TC. Estudo morfológico da cistogênese do *Toxoplasma gondii* e sua interação com a célula hospedeira. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas] – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho –UFRJ; 2015.
- Pedersen NC, Theilen GH, Werner LL. Safety and efficacy studies of live- and killed-feline leukemia virus vaccines. *Am J Vet Res.* 1979 Aug;40(8):1120-6.
- Pedersen BL, Brøndsted H, Lennernäs H, Christensen FN, Müllertz A, Kristensen HG. Dissolution of hydrocortisone in human and simulated intestinal fluids. *Pharm Res.* 2000 Feb;17(2):183-9.
- Pereira C, Araújo F, Barrias CC, Granja PL, Sarmiento B. Dissecting stromal-epithelial interactions in a 3D *in vitro* cellularized intestinal model for permeability studies. *Biomaterials.* 2015 Jul;56:36-45.
- Perreault N, Beaulieu JF. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res.* 1996 May 1;224(2):354-64.
- Piao, C. Q., L. Liu, Y. L. Zhao, A. S. Balajee, M. Suzuki, and T. K. Hei. 2005. Immortalization of human small airway epithelial cells by ectopic expression of telomerase. *Carcinogenesis* 26(4):725–31.
- Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A. Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol.* 1994 Jan;65(1):71-8.
- Potten CS, Grant HK. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer.* 1998 Oct;78(8):993-1003.
- Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol.* 1979 Feb;80(2):248-65.
- Quaroni A. Crypt cell development in newborn rat small intestine. *J Cell Biol.* 1985 May;100(5):1601-10.
- Quaroni A. Fetal characteristics of small intestinal crypt cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Mar;83(6):1723-7.
- Quaroni A, Beaulieu JF. Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 1997 Oct;113(4):1198-213.
- Quinlan JM, Yu WY, Hornsey MA, Tosh D, Slack JM. *In vitro* culture of embryonic mouse intestinal epithelium: cell differentiation and introduction of repórter genes. *BMC Dev Biol.* 2006 May 25;6:24.

- Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Oct;131(2):119-27.
- Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol*. 2005 Dec 2;3:26.
- Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome ME, Behnke MS, Liberator P, White MW. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog*. 2006 Oct;2(10):e105.
- Remington JS, Cavanaugh EN. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med*. 1965;273:1308-1310.
- Ricard J, Pelloux H, Gross U, Meunier A, Ambroise-Thomas P. Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor. *J Parasitol*. 1999 Jun;85(3):583-5.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Apr;25(2):264-96.
- Roghmam MC, Faulkner CT, Lefkowitz A, Patton S, Zimmerman J, Morris JG Jr. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 May;60(5):790-2.
- Romano JD, Sonda S, Bergbower E, Smith ME, Coppens I. *Toxoplasma gondii* salvages sphingolipids from the host Golgi through the rerouting of selected Rab vesicles to the parasitophorous vacuole. *Mol Biol Cell*. 2013 Jun;24(12):1974-95.
- Rusu D, Loret S, Peulen O, Mainil J, Dandriofosse G. Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures. *BMC Cell Biol*. 2005 Dec 1;6:42.
- Russell WMS and Burch R L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959. London: Methuen and Co. Ltd.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. 2005 Oct;21(10):476-81.
- Sahm M, Fischer HG, Gross U, Reiter-Owona I, Seitz HM. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* *in vivo* and in brain-cell culture: a comparative morphology and immunocytochemistry study. *Parasitol Res*. 1997;83(7):659-65.
- Sanderson IR, Ezzell RM, Keding M, Erlanger M, Xu ZX, Pringault E, Leon-Robine S, Louvard D, Walker WA. Human fetal enterocytes *in vitro*: modulation of the phenotype by extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7717-22.

- Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Sep;68(18):3033-46.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol.* 2014 Oct;304(7):917-29.
- Schörkhuber M, Karner-Hanusch J, Sedivy R, Ellinger A, Armbruster C, Schulte-Hermann R, Marian B. Survival of normal colonic epithelial cells from both rats and humans is prolonged by coculture with rat embryo colonic fibroblasts. *Cell Biol Toxicol.* 1998 Jun;14(3):211-23.
- Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 18;91(2):509-13.
- Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ, Joiner KA, Coppens I. Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic.* 2005 Dec;6(12):1125-41.
- Shen B, Sibley LD. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2012 Aug;15(4):449-55.
- Sher A, Collazzo C, Scanga C, Jankovic D, Yap G, Aliberti J. Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Res.* 2003;27(2-3):521-8.
- Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):72-91.
- Siddiqui KM, Chopra DP. Primary and long term epithelial cell cultures from human fetal normal colonic mucosa. *In Vitro.* 1984 Nov;20(11):859-68.
- Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Keding M. *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol.* 2007 Jul;23(4):241-56.
- Sims TA, Hay J, Talbot IC. An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. *Br J Exp Pathol.* 1989 Jun;70(3):317-25.
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.* 1997 (110):2117-2128.
- Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 2001 154:95-108.
- Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res.* 2010 Jul;107(2):253-60.

- Soète M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. Exp Parasitol. 1993 May;76(3):259-64.
- Soète M, Camus D, Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. Exp Parasitol. 1994 Jun;78(4):361-70.
- Speer CA, Clark S, Dubey JP. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1998 Jun;84(3):505-12.
- 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 Feb;35(2):193-206.
- Splendore A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. Rev Soc Sci São Paulo. 1908 3: 109-112.
- Stauffer JS, Manzano LA, Balch GC, Merriman RL, Tanzer LR, Moyer MP. Development and characterization of normal colonic epithelial cell lines derived from normal mucosa of patients with colon cancer. Am J Surg. 1995 Feb;169(2):190-5; discussion 195-6.
- Sträter J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Möller P. Rapid onset of apoptosis *in vitro* follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. Gastroenterology. 1996 Jun;110(6):1776-84.
- Stutz A, Kessler H, Kaschel ME, Meissner M, Dalpke AH. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. Immunobiology. 2012 Jan;217(1):28-36.
- Swierzy IJ, Muhammad M, Kroll J, Abelmann A, Tenter AM, Lüder CG. *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. Int J Parasitol. 2014 Feb;44(2):91-8.
- Swierzy IJ, Lüder CG. Withdrawal of skeletal muscle cells from cell cycle progression triggers differentiation of *Toxoplasma gondii* towards the bradyzoite stage. Cell Microbiol. 2015 Jan;17(1):2-17.
- Tabuchi Y, Ohta S, Arai Y, Kawahara M, Ishibashi K, Sugiyama N e cols. Establishment and characterization of a colonic epithelial cell line MCE301 from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. Cell Struct Funct. 2000 Oct;25(5):297-307.
- Takács AC, Swierzy IJ, Lüder CG. Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. PLoS One. 2012;7(9):e45440.

- Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-58. Review. Erratum in: Int J Parasitol 2001 Feb;31(2):217-20.
- Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Mar;104(2):364-9.
- Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 1991 Oct;59(10):3750-3.
- Tomita T, Bzik DJ, Ma YF, Fox BA, Markillie LM, Taylor RC, Kim K, Weiss LM. The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003823.
- Traber PG, Gumucio DL, Wang W. Isolation of intestinal epithelial cells for the study of differential gene expression along the crypt-villus axis. Am J Physiol. 1991 Jun;260(6 Pt 1):G895-903.
- Van Mouwerik TJ, Pangallo CA, Willson JK, Fischer PH. Augmentation of methotrexate cytotoxicity in human colon cancer cells achieved through inhibition of thymidine salvage by dipyridamole. Biochem Pharmacol. 1987 Mar 15;36(6):809-14.
- Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, Dubey JP, Jones JL, Doymaz MZ, Bruckner DA, Belfort R Jr, Holland GN, Grigg ME. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. J Infect Dis. 2010 Oct 15;202(8):1226-33.
- Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brezin AP, Thulliez P, Wallon M, King L, Goulet V; Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. Euro Surveill. 2010 Jun 24;15(25).
- Wang J, Hu G, Lin Z, He L, Xu L, Zhang Y. Characteristic and functional analysis of a newly established porcine small intestinal epithelial cell line. PLoS One. 2014 Oct 22;9(10).
- Wang Y, Fang R, Yuan Y, Hu M, Zhou Y, Zhao J. Identification of host proteins interacting with the integrin-like A domain of *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC2 by yeast-two-hybrid screening. Parasit Vectors. 2014 Nov 26;7:543.
- Wang Y, Yin H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors. 2015 Jul 22;8:384.
- Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP. Novel Approaches Reveal that *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are Dynamic and Replicating Entities *In Vivo*. MBio. 2015 Sep 8;6(5). pii: e01155-15.

- Weilhammer DR, Iavarone AT, Villegas EN, Brooks GA, Sinai AP, Sha WC. Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2012 Sep;42(10):947-59.
- Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Euk Microbiol*. 1995;42:150-157
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. 2000 Apr 1;5:D391-405.
- Weng LX, Fu XB, Li XX, Sun TZ, Zheng SY, Chen W, Li JY. Protective effects of acidic fibroblast growth factor on intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2005 Feb;17(2):98-101.
- White MW, Radke JR, Radke JB. *Toxoplasma* development - turn the switch on or off? *Cell Microbiol*. 2014 Apr;16(4):466-72.
- Whitehead RH, Brown A, Bhathal PS. A method for the isolation and culture of human colonic crypts in collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1987 Jun;23(6):436-42.
- Worliczek HL, Ruttkowski B, Schwarz L, Witter K, Tschulenck W, Joachim A. Isospora suis in an epithelial cell culture system - an *in vitro* model for sexual development in coccidia. *PLoS One*. 2013 Jul 5;8(7):e69797.
- Yamamoto JK, Pu R, Arai M, Pollock D, Irausquin R, Bova FJ, Fox LE, Homer BL, Gengozian N. Feline bone marrow transplantation: its use in FIV-infected cats. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998 Oct 23;65(2-4):323-51.
- Yan X, Ji Y, Liu X, Suo X. Nitric oxide stimulates early egress of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from Human foreskin fibroblast cells. *Parasit Vectors*. 2015 Aug 13;8:420.
- Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):109-21.
- Yip YL, Pang PS, Deng W, Tsang CM, Zeng M, Hau PM, Man C, Jin Y, Yuen AP, Tsao SW. Efficient immortalization of primary nasopharyngeal epithelial cells for EBV infection study. *PLoS One*. 2013 Oct 22;8(10):e78395.
- Zabner, J., P. Karp, M. Seiler, S. L. Phillips, C. J. Mitchell, M. Saavedra, M. Welsh, and A. J. Klingelutz. 2003. Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(5): L844–54.
- Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Tanowitz HB, Weiss LM. A Purification Method for Enrichment of the *Toxoplasma gondii* Cyst Wall. *J Neuroparasitology*. 2010 Dec;1. pii: N101001.