

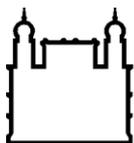
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* E CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DE
FELINOS *IN VITRO***

LETÍCIA CAMPOS MEDEIROS

Rio de Janeiro
Abril de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LETÍCIA CAMPOS MEDEIROS

INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* E CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DE FELINOS *IN VITRO*

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helene Santos Barbosa

RIO DE JANEIRO
Abril de 2019

Campos Medeiros, Leticia.

Interação de *Toxoplasma gondii* e células epiteliais intestinais de felinos *in vitro* / Leticia Campos Medeiros. - Rio de Janeiro, 2019.
105 f.

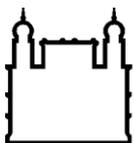
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Helene Santos Barbosa.

Bibliografia: f. 81-89

1. *Toxoplasma gondii*. 2. células epiteliais intestinais de felinos. 3. cultura primária. 4. ciclo enteroepitelial. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: LETÍCIA CAMPOS MEDEIROS

INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* E CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DE FELINOS *IN VITRO*

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Helene Santos Barbosa

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Mirian Cláudia Pereira - Revisora e Presidente (IOC/Fiocruz)

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

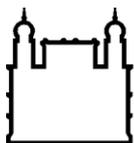
Prof^ª. Dr^ª. Erika Afonso Costa Cortez Marques (IB/UERJ)

Suplentes:

Prof. Dr. Rubem F S Menna-Barreto (IOC/Fiocruz)

Prof^ª. Dr^ª. Kelly Salomão (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 10 de abril de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedicado a Itchie, eterno companheiro
que me viu crescer e foi se juntar às
estrelas no céu durante este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras para expressar a minha imensa gratidão por estar concluindo esta etapa. Só tenho a agradecer a todas as pessoas que percorreram comigo esta estrada, ou mesmo que apenas passaram por ela brevemente, trilhando outros caminhos. Todas essas pessoas, direta ou indiretamente, deixaram uma contribuição para a realização deste trabalho. Houve dias em que eu, por exemplo, desanimada neste percurso por tantas vezes penoso, consegui forças para continuar graças a um sorriso da Nice, a faxineira, sempre animada, apesar do serviço árduo e de imensa responsabilidade. Afinal, um laboratório contaminado não produzirá resultado algum.

Agradeço à minha família, por ter me apoiado e às vezes até me carregado quando eu não podia mais andar. Minha mãe é uma inspiração para mim, uma mulher tão forte, e é capaz de amortecer todas as dificuldades que puder para o bem dos filhos. Inspiro-me na calma e paciência do meu pai, que parece estar sempre nas nuvens, com certeza um dom para se manter sereno. Fico muito feliz por ter meus irmãos ao meu lado, sei que hoje as famílias estão diminuindo, então sinto-me sortuda de ter crescido com eles. Com certeza, só sou o que sou hoje graças à minha família, e hoje finalmente entendo o imenso valor dela, uma vez que são poucos os exemplos de família unida. Agradeço também ao membro mais novo da família, meu sobrinho Bernardo, que me permite expressar a criança dentro de mim ao acompanhá-lo nos jogos e brincadeiras.

Luiz, meu companheiro de todas as horas. Sinto-me imensamente grata por ter estado ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada por ter compartilhado todas as alegrias nos momentos felizes e por não ter desistido de mim nos momentos mais difíceis. Eu certamente não seria a mesma sem você. Fico muito feliz de te ter ao meu lado, formando uma família junto a nossos “filhos” de quatro patas.

Agradeço à minha orientadora, Helene, pela imensa paciência, uma vez que cheguei tão “crua” ao laboratório. Obrigada por ampliar minha visão sobre a Ciência e por compreender e respeitar minhas limitações. Agradeço às demais alunas do grupo, que me ajudaram muito principalmente no começo, quando eu estava perdida, e também ao final, ao sempre oferecerem ajuda. Agradeço também à toda a equipe do LBE, pela disponibilidade no que fosse preciso e também pela companhia. Agradeço aos amigos que fiz, Catarina, Carol, Gabriel, Jéssica, Laíza, Liandra, Manu, Marcelli,

Mariana, Viviane. Vocês tornaram os meus dias mais leves. Agradeço muito à Renata, por ter me ensinado com tanta paciência a fazer as soluções e a cultura primária, era o que eu precisava para começar a fazer o trabalho andar.

Sandra, muitíssimo obrigada por me ensinar praticamente tudo o que eu sei da prática de laboratório. Muito obrigada por me levantar quando eu estava caída e por me ajudar tanto com as culturas. Sei que o resultado que obtivemos se deveu principalmente aos seus anos de experiência em cultivo celular. Obrigada também por estar sempre ao meu lado, por estar sempre disponível quando preciso, por dançar comigo nas festas, por ser minha amiga.

Agradeço a todos os meus amigos, Bianca, Camila, Carlos, Dani, Guilherme, Felipe, Lívia, Paulo, Tsu, por estarem sempre comigo, mesmo que fisicamente distantes. Sou imensamente grata por tê-los em minha vida, uma vez que é tão difícil encontrar pessoas como vocês que, mesmo que por vezes fiquemos muito tempo sem nos ver, quando nos reencontramos é como se nunca tivéssemos nos separado.

Muito obrigada também aos meus amigos de sangue, meus primos. Os primos são as primeiras amizades que fazemos na vida, e sou muito grata por ter vindo do interior e, conseqüentemente, ter muitos deles. Agradeço principalmente à Taís e Priscila, que estiveram mais próximas de mim durante esses dois anos. Agradeço imensamente aos meus avós, que tornaram isso possível. Sinto muita falta de vocês.

Sou imensamente grata por ter reavido meus maiores amigos de infância, Gustavo e Caio. Fiquei muito feliz de sentir a mesma química de antigamente. Dou muito valor a este reencontro, que foi uma das coisas que me animaram e me ajudaram a ganhar impulso para concluir este trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro, ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pela estrutura profissional e acadêmica oferecida, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTERAÇÃO DE *Toxoplasma gondii* E CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DE FELINOS *IN VITRO*

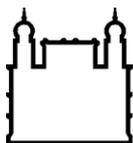
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Letícia Campos Medeiros

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório disseminado pelo mundo, capaz de infectar células nucleadas de todos os animais de sangue quente: aves e mamíferos, incluindo o homem. Com grande promiscuidade em relação aos seus hospedeiros intermediários, *T. gondii* é altamente específico quanto à etapa sexuada de seu ciclo intestinal no seu hospedeiro definitivo, o felino. Apesar da importância do ciclo enteroepitelial para o ambiente, há grandes lacunas no entendimento deste ciclo. Grande parte do conhecimento atual é produto do desenvolvimento de pesquisas *in vivo* em décadas passadas. Hoje a eutanásia de gatos para fins científicos é praticamente proibida e como não existem linhagens contínuas de enterócitos de felinos disponíveis comercialmente, dificulta a realização de pesquisas *in vitro*. Assim, neste estudo aplicamos o modelo de cultura primária de células epiteliais intestinais de felinos (CEIF) como ferramenta para reproduzir o ciclo sexuada *in vitro* e identificar os estágios enteroepiteliais do parasito.

O monitoramento *in situ* das células epiteliais intestinais de felino mostrou a reprodutibilidade do fenótipo de enterócitos *in vitro* e sua característica ultraestrutural. Nas nossas condições experimentais, as monobras na variação da proporção parasito:célula hospedeira, confirmou que a relação 1:20 foi determinante para o estabelecimento tanto do ciclo lítico e da cistogênese quanto da indução de formas semelhantes a esquizontes, como revelados por microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Foram identificados esquizontes dos tipos C, D e E, apresentando características morfológicas similares às previamente descritas na literatura com base na análise de intestino de gatos infectados experimentalmente por *T. gondii*. Estes dados indicam que as CEIF simulam *in vitro* o microambiente celular natural intestinal do felino que favorece o desenvolvimento da esquizogonia. Esta metodologia abre novas perspectivas para investigação de aspectos biológicos e moleculares envolvidos no ciclo entérico de *T. gondii in vitro*. Além disso, possibilita agregar conhecimento para o desenvolvimento de novas estratégias direcionadas à intervenção da transmissão do parasito, visando interferir numa das principais vias pelas quais a toxoplasmose se propaga, pelas fezes de felinos contaminando o meio ambiente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTERACTION OF *Toxoplasma gondii* AND FELINE INTESTINAL EPITHELIAL CELLS *IN VITRO*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Letícia Campos Medeiros

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite protozoan spread throughout the world, capable of infecting nucleated cells of all warm-blooded animals: birds and mammals, including humans. With great promiscuity in relation to its intermediate hosts, *T. gondii* is highly specific as to the sexual stage of its intestinal cycle in its definitive host, the feline. Despite the importance of this enteroepithelial cycle to the environment, there are major gaps in the understanding of this cycle. Much of the current knowledge is the product of *in vivo* research development in the past decades. Today the euthanasia of cats for scientific purposes is practically forbidden and as there are no commercial lines of feline enterocytes, it is difficult to carry out *in vitro* researches. Thus, in this study we applied the primary culture model feline intestinal epithelial cells (FIEC) as a tool to reproduce the *in vitro* sexual cycle and to identify the enteroepithelial stages of the parasite.

In situ monitoring of feline intestinal epithelial cells showed the reproducibility of the enterocyte phenotype *in vitro* and its ultrastructural characteristic. In our experimental conditions, the strategies in the variation of the parasite:host cell ratio, confirmed that the ratio 1:20 was determinant for the establishment of both lytic cycle, cystogenesis and the induction of schizonts-like forms, as revealed by light and transmission electron microscopies. Schizotypes of types C, D and E were identified, presenting morphological characteristics similar to those previously described in the literature based on the intestine tissue analysis of cats experimentally infected by *T. gondii*. These data indicate that enterocytes cultures mimic *in vitro* the natural intestinal cellular microenvironment of the feline that favors the development of schizogony. This methodology opens new perspectives for the investigation of biological and molecular aspects involved in the enteric cycle of *T. gondii in vitro*. In addition, it allows to aggregate knowledge for the development of new strategies directed to the intervention of the transmission of the parasite, aiming to interfere in one of the main routes through which the toxoplasmosis propagates, by the faeces of felines contaminating the environment.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Breve histórico	1
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2.1 Formas infectivas.....	2
1.2.1.1 Taquizoítos.....	3
1.2.1.2 Bradizoítos e cistos teciduais.....	4
1.2.1.3 Esporozoítos.....	5
1.2.2 Ciclo biológico.....	6
1.2.2.1 Ciclo enteroepitelial.....	8
1.2.2.1.1 Esquizonte tipo A.....	8
1.2.2.1.2 Esquizonte tipo B.....	8
1.2.2.1.3 Esquizonte tipo C.....	9
1.2.2.1.4 Esquizonte tipo D.....	9
1.2.2.1.5 Esquizonte tipo E.....	10
1.2.2.1.6 Gametas e oocistos.....	10
1.2.2.3 Epidemiologia.....	13
1.2.2.4 Interação <i>T. gondii</i> - célula hospedeira.....	14
1.2.2.4.1 Ciclo lítico.....	15
1.2.2.4.2 Cistogênese.....	16
1.2.3 Epidemiologia.....	13
1.2.4 Interação <i>T. gondii</i> - célula hospedeira.....	14
1.2.4.1 Ciclo lítico.....	15
1.2.4.2 Cistogênese.....	16
1.3 Epitélio instestinal e cultura primária de enterócitos.....	18
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais experimentais.....	22
3.2 Cultura primária de enterócitos de felinos.....	22
3.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	24
3.3.1 Isolamento de cistos teciduais.....	24

3.3.2	Purificação dos cistos.....	24
3.3.3	Obtenção de bradizoítos.....	25
3.4	Interação entre <i>T. gondii</i> e células epiteliais intestinais de felinos (CEIF).....	26
3.5	Coloração pelo Giemsa.....	26
3.6	Análise Ultraestrutural.....	26
3.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
3.6.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	27
4	RESULTADOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.1	Cultura primária de enterócitos de felídeos	
4.1.1	Estabelecimento e análise morfológica das culturas.....	28
4.1.2	Aspectos morfológicos da infecção de enterócitos com bradizoítos de <i>T. gondii</i>	32
4.1.2.1	Ciclo lítico.....	32
4.1.2.2	Cistogênese.....	45
4.1.2.3	Ciclo enteroepitelial.....	52
5	DISCUSSÃO.....	64
6	PERSPECTIVAS.....	79
7	CONCLUSÕES	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organização estrutural dos três principais estágios evolutivos de *T. gondii*.

Figura 2: Ciclo biológico de *T. gondii*.

Figura 3: Desenvolvimento enteroepitelial de *T. gondii* no hospedeiro definitivo.

Figura 4: Aspectos morfológicos *in situ* das culturas primárias de enterócitos de felino por microscopia de contraste de fase.

Figura 5: Aspectos morfológicos *in situ* das culturas primárias de enterócitos de felino por microscopia de contraste de fase.

Figura 6: Aspectos morfológicos *in situ* das culturas primárias de enterócitos de felino por microscopia de contraste de fase.

Figura 7: Caracterização morfológica de culturas de enterócitos de felinos.

Figura 8: Caracterização morfológica de cultura de enterócitos de felinos.

Figura 9: Caracterização morfológica de cultura de enterócitos de felinos com 10 dias de cultivo.

Figura 10: Microscopia de contraste de fase de enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii*, na proporção 1:20 parasito-célula, *in situ*.

Figura 11: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção).

Figura 12: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (96 h de infecção).

Figura 13: Ultraestrutura de culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção).

Figura 14: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção).

Figura 15: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção).

Figura 16: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (72 h de infecção).

Figura 17: Cultura de enterócitos de felinos (CEIF) infectadas por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49.

Figura 18: Caracterização morfológica ultraestrutural de cultura de enterócitos de felinos infectada por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49, por períodos de 96h interação.

Figura 19: Ultraestrutura de enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49.

Figura 20: Ultraestrutura de enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 na proporção 1:10 parasito-célula, 96 horas de infecção.

Figura 21: Ultraestrutura de enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 na proporção 1:10 parasito-célula, 120h de infecção.

Figura 22: Ultraestrutura de enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49, proporção de 1:10 parasito-célula, 120h de infecção.

Figura 23: Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 48h.

Figura 24: Enterócito infectado por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 48h

Figura 25: Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 72h

Figura 26: Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 72h.

Figura 27: Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 após 96h de interação.

Figura 28: Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 após 96h de interação.

Figura 29: Ultraestrutura de enterócitos contendo esquizontes do tipo C.

Figura 30: Ultraestrutura de enterócitos contendo esquizontes do tipo C.

Figura 31: Ultraestrutura de enterócitos contendo esquizontes do tipo D.

Figura 32: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*.

Figura 33: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*.

Figura 34: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*.

Figura 35: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*.

Figura 36: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AF	Autofluorescência
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATP	Adenosina trifosfato
BPK1	Pseudoquinase bradizoíta 1
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEIF	Células Epiteliais Intestinais de Felino
CEUA-IOC	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz
CO ₂	Dióxido de carbono
cols	Colaboradores
DMEM/F12	Meio Eagle modificado por Dulbecco contendo a mistura de nutrientes de Ham (F12)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino ácido tetra-acético
EGTA	Etilenoglicol bis(2-aminoetileter) ácido tetra-acético
ENO1	Enolase-1
GA	Grânulos de amilopectina
GD	Grânulos denso
GP-PI	Glucose-6-fosfato dehidrogenase
HVN	Hospital Veterinário de Niterói
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LDH2	Lactato dehidrogenase 2
MCP4	Proteína de micronema com domínios repetidos de adesão-4
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Micronema
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PAS	Ácido periódico de Shiff
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Parede cística
PLP1	Proteína perforina-like 1
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo
RMT	Rede de membranas túbulovesicular
rpm	Rotações por minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SFB	Soro fetal bovino
SI	Sistema imunológico
T ₃	Sal de sódio 3,3', 5-triiodo-L-thyronina
TgGP	Glicogênio fosforilase do <i>T. gondii</i>
UV	Ultravioleta
VP	Vacúolo parasitóforo
WFB2	Corpos formadores de parede do tipo 2

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico

Toxoplasma gondii foi descoberto simultaneamente em 1908 por Nicolle e Manceaux, isolado do roedor nativo *Ctenodactylus gundi*, na África do Norte e por Splendore, isolado de coelhos, no Brasil. O nome *Toxoplasma* (toxon = arco, plasma = forma, em grego) foi atribuído ao parasito pela morfologia em meia lua. *T. gondii* é capaz de infectar qualquer hospedeiro de sangue quente, incluindo o homem, sendo um dos parasitos mais bem-sucedidos. O potencial patogênico do parasito começou a ser melhor estudado a partir das décadas de 1920 e 1930, com o surgimento de vários casos de toxoplasmose humana no mundo, principalmente decorrentes de infecção congênita. Na década de 1980, *T. gondii* emergiu como uma das principais causas de morte em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), demonstrando a importância do sistema imune no controle da infecção pelo protozoário e incrementando os estudos da doença e da biologia celular do parasito (Innes, 2010; revisto em Blader e cols., 2015). O ciclo biológico completo de *T. gondii* foi descrito em 1970 (revisto por Dubey, 2008, 2009; Ferguson, 2009), quando o oocisto foi identificado nas fezes de gatos caracterizando o desenvolvimento sexuado do parasito no epitélio intestinal de seu hospedeiro definitivo, o felino. O conhecimento específico do ciclo entérico de *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).

1.2 *Toxoplasma gondii*

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, apresentando uma estrutura comum ao Filo, o complexo apical localizado na região anterior do corpo do parasito (Dubey e cols., 1998). Este parasito é envolto por uma estrutura trimembranar formada pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno, que constituído pela associação íntima de longas cisternas achatadas. A ultraestrutura, vista por cortes transversais desta estrutura trimembranar, mostra a presença de duas unidades de membrana justapostas formando o complexo (Cintra & De Souza, 1985).

A membrana plasmática é contínua, porém o complexo interno é interrompido logo abaixo dos anéis polares do conóide (na extremidade anterior do parasito) na região do microporo, formado pela invaginação da membrana plasmática, e no poro posterior (Nichols e cols., 1994). Logo abaixo desta estrutura trimembranar, partindo do anel polar posterior, irradiam-se os microtúbulos subpeliculares que percorrem o corpo celular no eixo longitudinal até cerca de dois terços de sua extensão (Morrissette & Murray, 1997). Estes parasitos apresentam organelas típicas de células eucarióticas como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e Golgi (**Figura 1**). *T. gondii* contém ainda estruturas características, tais como microporo, microtúbulos subpeliculares, apicoplasto, acidocalcissoma, corpos lipídicos, complexo apical (onde se localiza o conóide formado pelos anéis apicais), anéis polares além das organelas secretoras, tais como as róptrias, micronemas e grânulos densos) (**Figura 1**) (Dubey e cols., 1998; de Souza e cols., 2010; Paredes-Santos e cols., 2012).

1.2.1 Formas infectivas

T. gondii apresenta 3 formas evolutivas responsáveis pela infecção do hospedeiro: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Durante o seu ciclo de vida, o parasito apresenta vários estágios evolutivos, mas as formas taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta são as principais formas infectivas envolvidas com a transmissão do parasito e responsáveis por infectar ambos hospedeiros intermediários e definitivos (**Figura 1**).

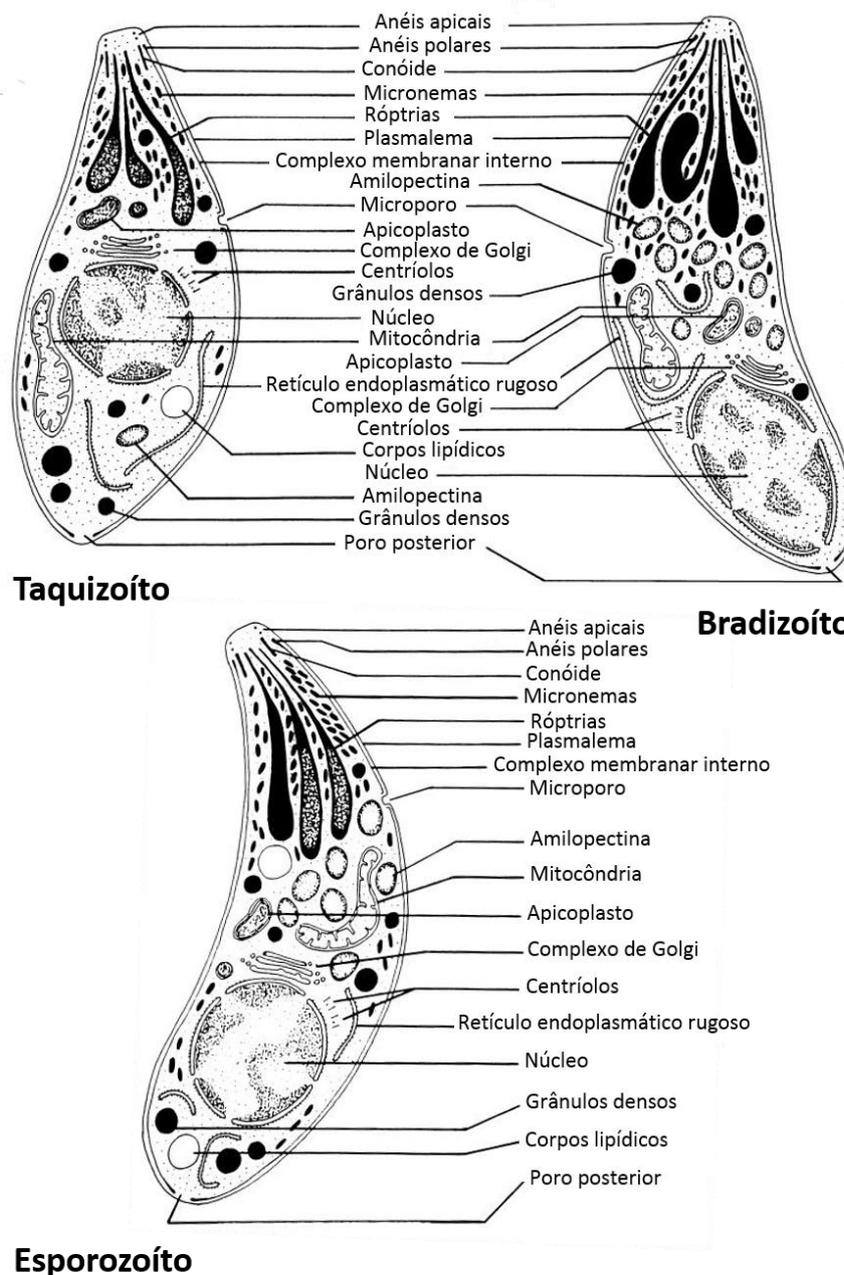


Figura 1: Organização estrutural dos três principais estágios evolutivos de *T. gondii*. As diferenças morfológicas entre os estágios são atribuídas ao perfil das róptrias, o número de grânulos de amilopectina e a posição do núcleo. Fonte: Adaptado de Dubey e cols. (1998).

1.2.1.1 Taquizoítos

Os taquizoítos representam o estágio infectivo mais estudado do ciclo de *T. gondii*, uma vez que a obtenção de grande quantidade de parasitos nesse estágio é fácil, tanto *in vivo* como *in vitro* (Ferguson e cols., 2014).

O termo “taquizoíto” (taqui = rápido, em grego) é utilizado para indicar o estágio que se multiplica rapidamente nas células do hospedeiro. Os taquizoítos medem cerca de 6 µm de comprimento e 2 µm de largura. A região anterior é afilada e a posterior é arredondada, caracterizadas pela presença de poucos ou nenhum grânulo de amilopectina, e o núcleo localiza-se na região mediana do corpo do parasito (Dubey e cols., 1998) (**Figura 1**).

A forma taquizoíta está presente nas manifestações clínicas da fase aguda da toxoplasmose, decorrentes de sua alta taxa de proliferação, com consequente ativação de uma forte resposta inflamatória por parte do hospedeiro. A forma taquizoíta também é responsável pela transmissão vertical do parasito para o feto, via placenta. A infecção ocorre quando o parasito entra em contato com a superfície da célula hospedeira e penetra ativamente através da membrana, sendo evidenciado a secreção de proteínas dos micronemas e róprias neste processo (revisto em Blader e cols., 2015).

Os taquizoítos proliferam rapidamente por endodiogenia, ou seja, uma forma especializada de reprodução na qual duas células filhas são formadas no interior de uma célula mãe, que se degenera ao fim do processo. Esta forma de divisão exclusiva ocorre durante a formação de taquizoítos e bradizoítos, mas difere do processo que ocorre no interior dos enterócitos do hospedeiro definitivo (de Souza e cols., 2010; Moura e cols., 2009; Moura e cols., 2013).

1.2.1.2 Bradizoítos e cistos teciduais

Após 10 a 14 dias de infecção, os taquizoítos, de replicação rápida, se diferenciam em bradizoítos, que são a forma de replicação lenta do parasito (bradi = lento, em grego). É o estágio infectivo do parasito que persiste durante a infecção crônica (latente) e é o único estágio que dá origem a fase sexual de *T. gondii* no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo, os felídeos. Mede aproximadamente 7 µm de comprimento e 1,5 µm de largura (Mehlhorn & Frenkel, 1980) e possuem multiplicação lenta por endodiogenia. Os bradizoítos se localizam no interior de cistos teciduais, que podem permanecer latentes a vida toda do indivíduo infectado. Em indivíduos imunocomprometidos, pode haver ruptura dos cistos e interconversão dos bradizoítos a taquizoítos, caracterizando uma reagudização da infecção (Lyons e

cols., 2002). O tamanho do cisto depende de sua idade, do tipo da célula hospedeira e da cepa de *T. gondii* (podendo conter centenas de bradizoítos) (Weiss & Kim, 2000). Os cistos permanecem intracelulares (no citoplasma da célula hospedeira) e possuem predileção pelos tecidos nervoso e muscular, podendo estar presentes principalmente no tecido ocular, cérebro, músculo esquelético e cardíaco. A parede cística é rica em açúcares e outros polissacarídeos (Speer e cols.,1998; Weiss & Kim, 2000; Guimarães e cols., 2003), e é fina e elástica, sendo composta de materiais derivados do hospedeiro e do parasito. O cisto é delineado por material granular, que também preenche o espaço entre os bradizoítos em seu interior, constituindo a matriz cística. A ultraestrutura dos bradizoítos difere levemente dos taquizoítos, pois os bradizoítos possuem o núcleo mais posterior, micronemas em grande quantidade, róprias eletrondensas e numerosos grânulos de amilopectina (**Figura 1**). São mais delgados que os taquizoítos e menos susceptíveis à destruição por enzimas proteolíticas (Dubey e cols., 1998).

Presume-se que os bradizoítos alterem a composição da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), constituindo a parede cística, dando origem aos cistos teciduais (Dubey, 1998a; Tenter e cols., 2000). Acredita-se que a parede do cisto possa conferir resistência evitando ruptura do mesmo, protegendo os bradizoítos de condições ambientais hostis, incluindo a resposta imunológica do hospedeiro. A proteína de parede cística CST1 foi identificada e tem papel crucial na integridade da parede, resistência contra o estresse mecânico e para a persistência dos bradizoítos (Tomita e cols., 2013).

1.2.1.3 Esporozoítos

Os esporozoítos são as formas infectivas de *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). Medem cerca de 6 a 8 µm de comprimento e 2 µm de largura e possuem um núcleo subterminal (Dubey e cols., 1998). Esses estágios apresentam numerosos grânulos densos e micronemas, róprias de aspectos esponjoso eletrondenso e pequena quantidade de grânulos de amilopectina (Speer e cols., 1998). Corpúsculos lipídicos são numerosos nos esporozoítos, raro em taquizoítos e ausentes em bradizoítos (Dubey e cols., 1998) (**Figura 1**).

1.2.2 Ciclo biológico

Os hospedeiros se infectam com *T. gondii* principalmente por meio da ingestão de cistos teciduais contidos em carnes cruas ou malcozidas (Dubey e cols., 2005; Hill e cols., 2010), de oocistos esporulados presentes em alimentos e água contaminados ou ainda, pela transmissão congênita (Hill & Dubey, 2002) (**Figura 2**). A infecção também pode ocorrer por meio de tecidos transplantados, transfusões de sangue e ingestão de leite não pasteurizado (Tenter e cols., 2000). A infecção via consumo de carne contaminada 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 (**Figura 2**). Ao alcançarem a lâmina própria do intestino, os bradizoítos se diferenciam em taquizoítos, que penetram e se multiplicam no interior das células e em poucas horas, após ruptura das células infectadas, se disseminam para outros tecidos por meio do sangue ou da linfa. Na infecção mediada pela ingestão de oocistos esporulados, da mesma forma que os cistos, os oocistos sofrem ação das enzimas proteolíticas no estômago do novo hospedeiro, liberando os esporozoítos, que, a depender da espécie do animal infectado, irão estabelecer o ciclo sexuado ou assexuado do parasito (Dubey, 1998) (**Figura 2**).

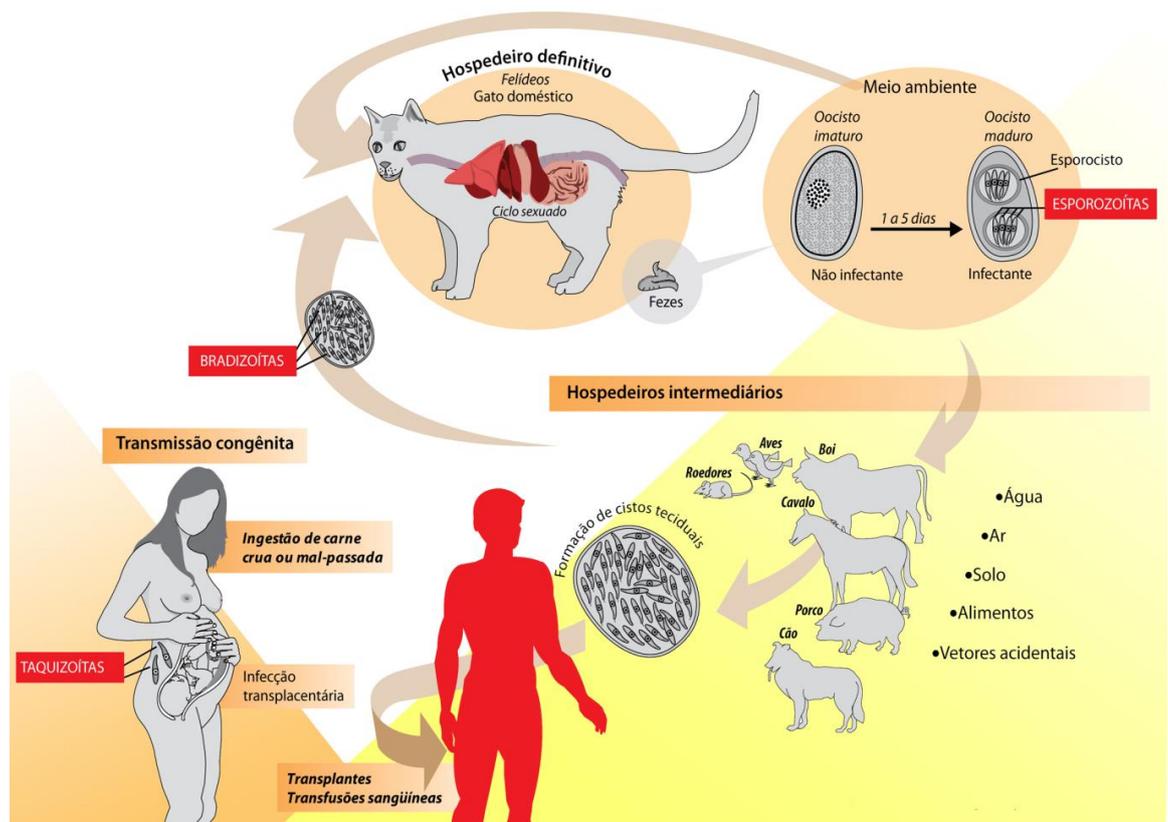


Figura 2: Ciclo biológico de *T. gondii*. A ilustração mostra as diferentes vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários representados pelas aves e mamíferos, incluindo o homem, e os hospedeiros definitivos, os felídeos. O ciclo compreende duas fases de reprodução: sexual e assexual. Fonte: Reproduzido de Moura e cols. (2009).

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, infectando o embrião ou feto (Montoya & 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).

1.2.2.1 Ciclo enteroepitelial

No felino, hospedeiro definitivo de *T. gondii*, pode ocorrer tanto o ciclo sexual do parasito (ciclo enteroepitelial), como também o ciclo assexuado (ciclo lítico). Os felinos liberam oocistos nas fezes após 3 a 10 dias da ingestão de bradizoítos, 18 dias ou mais após a ingestão de oocistos esporulados e 13 dias ou mais após a ingestão de taquizoítos. O ciclo sexual induzido pela ingestão de bradizoítos (por carnivorismo) é o mais estudado e apresenta elevada eficiência na produção de oocistos. Milhões de oocistos são produzidos no intestino do felino devido à multiplicação profusa de *T. gondii*, geralmente sem provocar sinais clínicos. Após a ingestão de bradizoítos, cinco formas assexuais morfológicamente distintas, denominados esquizontes (tipos A-E), são formadas no intestino delgado do felino, resultando, ao final, na formação de oocistos (Dubey, 1998). Os oocistos liberados nas fezes dos felinos tornam-se infectivos após a esporulação, que ocorre de 2 a 3 dias dependendo das condições no solo, umidade e temperatura (Frenkel e cols., 1970).

1.2.2.1.1 Esquizonte tipo A

É o primeiro estágio de desenvolvimento observado no intestino dos gatos (**Figura 3**) a partir de 12 h de infecção. Possuem núcleo centralizado, facilmente 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).

1.2.2.1.2 Esquizonte tipo B

Este tipo de esquizonte ocorre de 25 a 54 h pós-infecção (**Figura 3**). A divisão destes organismos ocorre por endodiogenia. Localizam-se em um grande VP de membrana delgada, constituído por uma rica rede de membranas tubulovesicular (RMT). Ultraestruturalmente, os esquizontes tipo B são muito similares aos taquizoítos, medindo 5,8 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 estruturas grandes multinucleadas. Estas formas multinucleadas apresentam numerosos corpos lipídicos

e mitocôndria com matriz eletrondensa moderada (Dubey & Frenkel, 1972; Speer e cols., 1998; Speer & Dubey, 2005).

1.2.2.1.3 Esquizonte tipo C

Os esquizontes do tipo C se desenvolvem de 32 a 54 h no interior do VP. Individualmente são alongados com o núcleo subterminal (Dubey & Frenkel, 1972) e medem cerca de 6,0 x 1,5 μm , multiplicando-se no interior de enterócitos ou linfócitos intraepiteliais por endopoligenia. A nível Ultraestrutural, os esquizontes do tipo C contêm poucos micronemas, poucos 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 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 & Dubey, 2005).

1.2.2.1.4 Esquizonte tipo D

A partir de 40 h pós-ingestão de cistos teciduais, os esquizontes do tipo D, medindo cerca de 5,8 x 1,3 μm , são observados em grande quantidade na base das vilosidades de células epiteliais intestinais (**Figura 3**). A nível ultraestrutural, os esquizontes do tipo D apresentam róptrias eletrondensas e vacúolos preenchidos com material granular localizados acima do complexo de Golgi (Speer & Dubey, 2005).

1.2.2.1.5 Esquizonte tipo E

Os esquizontes do tipo E, medindo cerca de 4,5 x 1,1 μm , surgem a partir de esquizontes do tipo D que migraram para células vizinhas e se replicaram por endopoligenia. Estes esquizontes são observados partir de 3 a 15 dias pós-infecção (**Figura 3**). 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 róptrias eletrondensas, mitocôndrias grandes e diversos corpos granulares (Speer & Dubey, 2005).

Nas fases evolutivas, os esquizontes dos tipos A, B, C, D e E parecem ser exclusivos do ciclo de *T. gondii*. 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 & Frenkel, 1972).

1.2.2.1.6 Gametas e oocistos

Gametas e oocistos estão presentes de 4 a 6 dias após a infecção e se desenvolvem exclusivamente nos enterócitos (**Figura 3**). 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: microgameta ou macrogameta. Os microgametas (5,7 x 3,5 μm), também denominados microgametócitos, possuem o núcleo pequeno, citoplasma mais claro, comparando-se com os esquizontes tipos D e E (**Figura 3**), além de dois flagelos (Dubey & 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 eletronalucente (Speer & Dubey, 2005).

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 espermatozoide 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 ou macrogametócito também são comumente empregados. A maturação dá origem a um único macrogameta. Os macrogametócitos têm funções muito importantes: 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 a formação da parede do oocisto. Por este motivo, durante o desenvolvimento, não ocorre divisão nuclear, mas à 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 & 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).

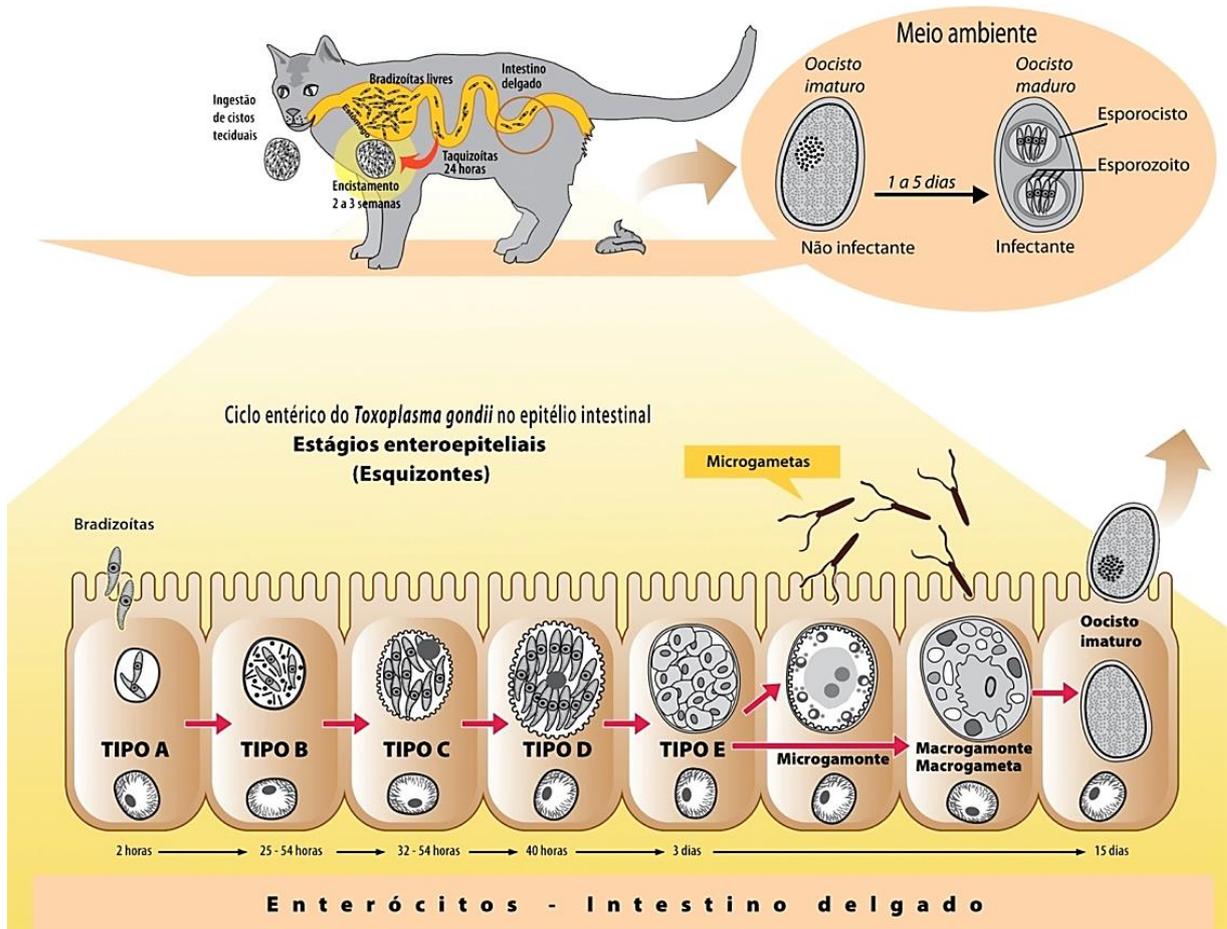


Figura 3: Desenvolvimento enteroepitelial de *T. gondii* no hospedeiro definitivo. Liberados na luz do trato gastrointestinal dos gatos, os bradizoítos infectam os enterócitos, diferenciam-se em diferentes estágios evolutivos (esquizontes tipos A, B, C, D, E, macro e microgametas) finalizando com a formação e liberação de oocistos nas fezes. Fonte: Reproduzido de Moura e cols. (2009).

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 dos oocistos 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 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 e na resistência global do oocisto a vários agentes físicos e químicos (Belli e cols., 2006; Dumètre e cols., 2012). 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, conferindo assim, alta infectividade para os seres humanos e animais (Dumètre e cols., 2013).

1.2.3 Epidemiologia

Os felídeos têm um papel preponderante na epidemiologia de *T. gondii*, sendo o único hospedeiro definitivo capaz de facilitar a propagação sexual do parasito. Os felinos podem produzir milhões de oocistos durante a infecção primária, causando enorme impacto ambiental, pois após a esporulação, os oocistos se tornam infecciosos para hospedeiros que acidentalmente ingerem produtos contaminados. Os fatores de risco de infecção para a ingestão de oocistos é a falta de higiene e o consumo de água ou vegetais contaminados (revisto em Delahoy e cols., 2018). Os oocistos esporulados podem sobreviver por longos períodos em condições normais de ambiente, ou até mesmo por meses em ambientes desfavoráveis. Os oocistos presentes no ambiente podem ser transmitidos mecanicamente por invertebrados como moscas, baratas, besouros e minhocas, contaminando alimentos (revisto em Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Mais recentemente, alguns mamíferos marinhos também foram descritos como portadores do parasito, além da descoberta da viabilidade de oocistos em animais não vertebrados filtradores, o que potencializa o risco de infecção deste grupo de animais (Miller e cols., 2004; Massie e cols., 2010; VanWormer e cols., 2016).

A importância epidemiológica dos bradizoítos contidos em cistos teciduais é bem conhecida, e estima-se que os alimentos contribuam para uma proporção (entre 42% e 61%) de todos os casos, dependendo da área geográfica (WHO, 2014). A aquisição de infecção pela via oral é um evento fundamental para a biologia de *T. gondii* (revisto em Belluco e cols., 2017) e esta rota é independente da reprodução sexual do parasito, ampliando a infecção de quase todos os animais de sangue quente (Su, 2003) o que provavelmente explica o sucesso evolutivo de *T. gondii*.

Um terceiro estágio infeccioso do parasita é o taquizoito, que pode ser transmitido por fluidos animais. O leite é considerado uma fonte potencial de infecção, já que durante a infecção animal aguda os taquizoítos circulantes podem ser transferidos do sangue para o leite (Tenter e cols., 2000), mas o debate sobre isso ainda está em andamento na comunidade científica (Dehkordi e cols., 2013; Dubey & Jones, 2014; Boughattas, 2015). Desta forma, os alimentos desempenham um papel crítico na transmissão de *T. gondii*. O parasito tem sido detectado em diferentes tipos de carnes (Guo e cols., 2015; Belluco e cols., 2016), vegetais (Lass e cols., 2012) e leite (Dehkordi e cols., 2013). Qualquer que seja a fonte de alimento, os hábitos de consumo desempenham um papel crítico, uma vez que *T. gondii* pode ser inativado por cozimento e congelamento.

1.2.4 Interação *T. gondii* - célula hospedeira

T. gondii invade as células-alvo por meio de um mecanismo dinâmico, penetrando ativamente na célula-hospedeira, em um processo dependente de actina e miosina do parasito que está localizado sob sua membrana plasmática (revisto em Frénel e cols., 2017). Essa maquinaria de deslizamento, chamada de glideossomo (Opitz & Soldati, 2002), permite que o parasito se mova ativamente através de barreiras biológicas não-permissivas (migração), penetre rapidamente em vários tipos de células (invasão) (Hakansson e cols., 1999; revisto em Blader e cols., 2015) e egresso das células infectadas (saída) (revisto em Blackman e Carruthers, 2013). Micronemas e proteínas das róprias e grânulos densos são secretadas em uma série de eventos precisamente orquestrados durante a invasão. O conteúdo dos micronemas é descarregado primeiramente durante o contato inicial do polo apical do parasito com a superfície da célula-alvo e imediatamente as róprias injetam seus conteúdos no citoplasma da célula. Durante a entrada na célula hospedeira, os parasitos induzem a formação de um VP oriundo da invaginação da membrana plasmática da célula alvo. Quando o parasito se encontra completamente encapsulado no VP, há liberação de proteínas no lúmen do VP pelos grânulos densos (revisto em Blader e cols., 2015). A MPV não fusogênico é isolada dos compartimentos endossomais e garante replicação segura (Mordue e cols., 1999). Após a replicação, os parasitos saem de uma célula infectada, rompendo a MPV e da célula hospedeira para invadir rapidamente as células vizinhas; assim, a motilidade contribui para a

disseminação da infecção.

Por meio de estudos bioquímicos e genéticos, pode-se chegar às seguintes conclusões gerais: as proteínas dos grânulos densos modificam o VP para a aquisição de nutrientes da célula-hospedeira; proteínas das róprias têm função na biogênese do VP e no estabelecimento da associação de organelas da célula-hospedeira com o VP e, proteínas dos micronemas atuam na adesão e penetração do parasito na célula-alvo.

1.2.4.1 Ciclo lítico

O ciclo lítico de *T. gondii* tem sido diferenciado em cinco etapas: adesão, invasão, formação de VP, replicação e egresso, com sinalização de cálcio identificada como um regulador crítico. Embora nos últimos 15 anos estas etapas básicas não tenham mudado, novas descobertas alcançadas pelos avanços tecnológicos e pelo melhor acesso experimental ao *Toxoplasma* (manipulação genética, por exemplo) melhoraram a compreensão e os detalhes de suas conexões. De destaque, o egresso agora é visto como ligado à invasão. Além disso, a compreensão da estrutura e função do VP e sua interface com a célula hospedeira e ainda, os detalhes moleculares nas vias de sinalização que permeiam cada etapa do ciclo lítico tem avançado neste período (revisto em Blader e cols., 2015).

Parasitos no meio extracelular e intracelular representam dois estágios biológicos distintos: os do meio extracelular não se dividem, são altamente móveis, fazem extrusão do conóide e secretam o conteúdo de seus micronemas. Enquanto parasitos no meio intracelular, se dividem, não são móveis, não fazem extrusão do conóide, nem secreção do conteúdo dos micronemas. A ativação do estágio extracelular pode ser considerada o primeiro passo do ciclo lítico e tem seus gatilhos propostos na presença ou ausência de resposta imune do hospedeiro. Várias vias da imunidade do hospedeiro respondem à infecção por *T. gondii*, e algumas são caminhos para o egresso do parasito. Danos à célula hospedeira levam a uma queda de K^+ intracelular e juntamente com o acúmulo de Ca^{+2} induzem ao egresso do parasito (revisto em Plattner e cols., 2012). Na ausência de uma resposta imunológica do hospedeiro, os parasitos se replicam e iniciam o egresso por diversos mecanismos. Um destes mecanismos envolve o aumento da concentração do ácido abscísico

(ABA), que é produzido durante a replicação intracelular. Sabe-se que a interferência farmacológica sobre a produção do ABA induz a diferenciação na forma bradizoíta, sugerindo ter diferentes papéis durante o ciclo de vida do parasito (Nagamune e cols., 2008). A acidificação do VP durante a replicação do parasito é especialmente relevante para proteína perforina-like 1 (PLP1), uma proteína do micronema, que se insere em membranas em pH baixo e forma poros na MVP e da célula hospedeira, para fornecer um caminho para o ambiente extracelular (Kafsack e cols., 2009).

Esse conjunto de dados mostra que o egresso de *T. gondii* da célula hospedeira envolve vários mecanismos e que vias individuais são ativadas por diferentes condições microambientais e múltiplas vias podem se comunicar ou convergir. Portanto, o momento do egresso é controlado pelo parasito e não é devido a uma simples ruptura física da célula hospedeira (revisto em Caldas & de Souza, 2018).

Após o egresso, os taquizoítos se movem no ambiente extracelular. O tempo gasto no meio extracelular é curto, mas fornece ao parasito a oportunidade de se disseminar para novos tecidos.

1.2.4.2 Cistogênese

Os taquizoítos e bradizoítos são bem definidos morfologicamente, mas não há um consenso sobre como ocorre o processo de conversão taquizoíta ↔ bradizoíta, desencadeando a cistogênese ou que sinal (ais) medeiam essa diferenciação. O ácido abscísico parece ter um papel decisivo no destino intracelular de *T. gondii*. Assim, a sinalização de cálcio mediada por este ácido influencia diretamente no direcionamento para o ciclo lítico ou a cistogênese. Desta forma, experimentalmente tem se demonstrado que a inibição da produção do ácido abscísico leva ao encistamento (Nagamune e cols., 2008). O sistema imune do hospedeiro controla a infecção aguda induzindo a conversão taqui ↔ bradi com a formação de cistos teciduais que evadem do sistema imune e podem perdurar por toda vida do hospedeiro imunocompetente (Denkers e cols., 2004). Cistos teciduais são estruturas intracelulares que apresentam maior tropismo para os tecidos neural (principalmente o cérebro e globo ocular) e muscular (esquelético e cardíaco) servindo, portanto, como reservatórios para a reativação da toxoplasmose se o hospedeiro se torna imunocomprometido (Odell e cols., 2015). Cistos imaturos medem cerca de 5 µm, com ao menos dois parasitos em

seu interior, indicando que a formação da parede cística ocorre cedo no desenvolvimento dos bradizoítos. À medida que o cisto amadurece, mudanças em seu tamanho podem ser observadas devido à replicação dos bradizoítos em seu interior. No cenário da toxoplasmose experimental tem sido demonstrado que os fatores imunológicos não são, necessariamente, requeridos para a formação de cistos, uma vez que já foi observada *in vitro* a cistogênese espontânea. Dessa forma, alguns modelos foram estabelecidos e que podem ser adequados para estudar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de cistogênese na ausência de uma resposta do hospedeiro. Uma forte corrente sugere que o microambiente celular tenha papel fundamental para determinar a conversão de *T. gondii*, desencadeando a via da cistogênese (Guimarães e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2008; 2009a; 2009b; de Muno e cols., 2014).

Aparentemente os bradizoítos se utilizam de glicólise anaeróbia para a geração de ATP, uma vez que não possuem um ciclo de Krebs funcional. Mudanças no metabolismo de carboidratos vem da regulação diferencial de isoformas bradizoíto-específicas da lactato desidrogenase (LDH2), glucose-6-fosfato desidrogenase (GP-PI) e enolase-1 (ENO1), que apresentam estabilidade e propriedades enzimáticas diferentes daquelas presentes nos taquizoítos. Acredita-se que a LDH2 é importante para o estabelecimento da infecção crônica, uma vez que camundongos infectados com parasitos com deleção de LDH2 apresentaram quantidades bem menores de cistos no cérebro comparados ao controle (Abdelbaset e cols., 2017).

A persistência da infecção também depende da autofagia contínua e da rotatividade de organelas ou componentes celulares. A protease L de catepsina não é necessária para a replicação dos taquizoítos nos estágios iniciais do desenvolvimento de bradizoítos, mas é crítica para a viabilidade do cisto tecidual maduro. A ablação genética ou química da atividade da protease causou um acúmulo de autofagossomas não digeridos e perda da viabilidade dos bradizoítos, indicando que o parasito deve reciclar proteínas e organelas para persistir. Os cistos latentes também devem ser capazes de lidar com a exposição de vários radicais e subprodutos reativos do metabolismo; conseqüentemente, enzimas que atuam neste tipo de estresse são mais presentes durante a formação dos bradizoítos (Jeffers e cols., 2018).

1.3 Epitélio intestinal e cultura primária de enterócitos

O epitélio intestinal é de constituição simples formando uma monocamada. As células são polarizadas, com uma região basal e outra apical onde se localizam as protusões de membrana finas e alongadas, as microvilosidades, que conferem a alta capacidade de absorção deste epitélio (Booth e cols., 1999). Há também uma polaridade associada com a maturação de cada célula. As células das vilosidades do intestino delgado ou na luz da cripta do cólon são as mais maduras (ou diferenciadas) e não proliferam. Essas células diferenciadas são continuamente perdidas para o lúmen do intestino (polo apical do tecido). Uma proliferação massiva na região mediana das vilosidades (intestino delgado) ou criptas (cólon) substitui essas células, sendo as células-tronco, presentes na base da cripta intestinal, as principais responsáveis por essa repopulação celular. Nas posições mais basais da cripta estão concentradas as células mais imaturas – com o maior potencial de proliferação – e são responsáveis pelo cultivo do tecido intestinal. As células já diferenciadas não somente não proliferam, como também secretam produtos (muco, lisozima, etc.) que comprometem a cultura dos tipos celulares imaturos (Booth & O’Shea, 2002).

Os enterócitos desempenham um papel não apenas na absorção de nutrientes, mas também tem função crucial na imunofisiologia (Gronert e cols., 1998) e atuam como uma barreira para a entrada de micróbios e toxinas do lúmen no tecido (Mahida e cols., 1997; Walker, 2002; Sansonetti, 2002; Shen & Turner, 2006). Além disso, podem secretar citocinas e quimiocinas em resposta a sinais inflamatórios (Strober, 1998), ativando e recrutando células inflamatórias, bem como imunológicas (Gronert e cols., 1998). Quando estimulados atuam como células apresentadoras de antígenos (Blumberg e cols., 1991; Hershberg e cols., 1997). Estas células têm importância de estudo nas áreas como farmacologia, células-tronco, terapia genética e imunologia. Elas também são empregadas para o estudo de muitos processos biológicos, tais como permeabilidade e transporte (Weng e cols., 2005), diferenciação (Rusu e cols., 2005), migração (Stutzmann e cols., 2000), interação célula-matriz, apoptose, nos mecanismos envolvidos em patologias, incluindo os causados por agentes infecciosos (Peterson e Artis, 2014), que afetam a integridade celular intestinal, bem como estudos sobre a interação da célula intestinal com enteroparasitos, como por exemplo, *Toxoplasma gondii* (Evans e cols. 1994; Perreault e cols., 1998; Moura e cols., 2009).

Apesar destas importantes aplicações, os modelos de cultura celular de enterócitos totalmente diferenciados não estão bem estabelecidos (Chopra e cols., 2010).

Há intensa dificuldade no estabelecimento da cultura primária de epitélio intestinal, uma vez que estas células dependem da interação célula-célula ou célula-matriz e requerem muitos fatores de crescimento (Aldhous e cols., 2001). A falta de fatores de crescimento ou interação nestes sistemas e na matriz extracelular leva à indução de morte celular em um período de tempo muito curto (Strater e cols., 1996). O conhecimento da biologia celular e molecular dos enterócitos em desenvolvimento e diferenciação evoluiu durante as últimas décadas, devido a abordagens experimentais que permitem a diferenciação *in vitro* (revisito em Simon-Assmann e cols., 2007). Vários pesquisadores já estabeleceram métodos de cultura de células intestinais para diferentes espécies animais que mimetizam o desenvolvimento intestinal normal (Rusu e cols., 2005). Algumas estratégias têm sido utilizadas na tentativa de obter cultura intestinal em monocamada de células obtidas de explantes intestinais do indivíduo adulto (Aldhous e cols., 2001; Macartney e cols., 2000) ou utilizando células fetais (Quaroni, 1985; Sanderson e cols., 1996; Perreault & Jean-Francois, 1996). O principal problema com as células adultas é que, uma vez que as células intestinais são removidas da membrana basal e do estroma subjacente, a apoptose é iniciada em poucas horas, dificultando o estudo por muito tempo (Potten e cols., 1994; Strater e cols., 1995). O epitélio intestinal embrionário nas fases iniciais do desenvolvimento é composto por uma camada de células endodérmicas multiestratificadas circundada pelo mesênquima. Três tipos celulares de células diferenciadas (enterócitos, células caliciformes e células endócrinas) aparecem antes do início da formação da cripta que começa pouco antes do nascimento (Simon-Assmann e cols., 2007). Assim, para o sucesso do cultivo destas células estas devem permanecer viáveis e, ao mesmo tempo, devem exibir propriedades fenotípicas e funcionais reminiscentes ao epitélio intestinal normal (Golaz e cols., 2007).

Uma alternativa para sanar estes problemas de cultivo primário seria a obtenção de linhagens de células epiteliais intestinais, porém algumas dificuldades são detectadas que incluem: infecções microbianas das culturas, curta vida útil dos enterócitos *in vivo* (Quaroni e cols., 1979; Schmidt & Thews, 1995), seu estado diferenciado, bem como sua complexa interação com a matriz extracelular (Podolsky, 1993; Basson e cols., 1996). Ainda, o revestimento epitelial intestinal é também uma

camada altamente dinâmica renovada a cada 4-5 dias (Bader e cols., 2000). Devido à sua curta vida útil há uma rápida rotatividade de componentes celulares. Quando os enterócitos atingem a ponta da vilosidade, eles estão na forma totalmente diferenciada ganhando função absorptiva com a perda da atividade mitótica. O terceiro aspecto importante dessas células epiteliais é sua dependência da matriz extracelular. Assim, o modelo de cultura para enterócitos geralmente descreve o emprego de componentes da matriz extracelular (Hahn e cols., 1987). Devido às estas dificuldades inerentes às células epiteliais intestinais, as linhagens celulares para estas não estão facilmente disponíveis, apesar da sua necessidade em vários campos (Perreault & Beaulieu, 1998). As linhagens celulares disponíveis são geralmente de tecido fetal de roedores (Kedinger e cols., 1987; Evans e cols., 1997) ou de tecido de câncer intestinal (Simon-Assmann e cols., 2007). Todos estes modelos têm suas próprias limitações. As linhagens celulares mais utilizadas são as Caco-2 e HT29 originalmente derivadas de células de adenocarcinoma do cólon humano (Huang e cols., 2004; Parlesak e cols., 2006). No entanto, como células transformadas, esses modelos têm suas próprias limitações (Rousset, 1989; Moyer, 1990; Carriere e cols., 1994). Deste modo, é necessário desenvolver modelos de cultura simples e reprodutíveis para enterócitos.

Assim, no presente estudo, foram empregadas culturas primárias de células isoladas do epitélio intestinal fetal de felinos, estabelecidas por Moura e cols. (2009), visando caracterizar os aspectos morfológicos da interação de *T. gondii* e enterócitos na tentativa de reproduzir o ciclo enteroepitelial do parasito no seu hospedeiro definitivo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a interação de *Toxoplasma gondii* com a cultura primária de enterócitos de felinos (CEIF).

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar morfológicamente a cultura primária de enterócitos de felinos;
- b) Analisar a interação de formas bradizoítas de *T. gondii* com enterócitos de felinos;
- c) Caracterizar ultraestruturalmente o destino intracelular de *T. gondii* em enterócitos de felinos, com foco principal nos estágios esquizontes, *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (cepa C57BL/6 “inbred” criada em 1921 por C. C. Little no “Bussey Institute for Research in Applied Biology”) foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno em estante ventilada sob temperatura controlada e mantidos em biotério de experimentação do Instituto Oswaldo Cruz. Os camundongos não foram submetidos à privação alimentar ou hídrica, sendo oferecido ração comercial específica para a espécie e água *ad libitum*.

Todos os ensaios com uso de animais experimentais foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC) licença L042/2018 A1 e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos (“Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents/NACLAR”).

3.2 Cultura primária de enterócitos de felinos

Culturas primárias de células epiteliais intestinais de felinos (CEIF) foram obtidas de fetos com cerca de 20 dias de gatas prenhes, clinicamente saudáveis, doados pelo Hospital Veterinário de Niterói (HVN). Cirurgias de castração de caráter assistencialista são realizadas no HVN, sem detecção prévia de gestação por ultrassonografia por necessidade de redução de custos. As medicações sedação e pré-anestésicas: (0,2% acepromazina, dose 0,1 mg/kg e 50 mg/mL tramadol - dose 3 mg/kg); de indução da anestesia (50 mg/mL quetamina - dose 5 mg/kg e 20 mg/mL xilazina - dose 0,25 mg/kg) e de manutenção da anestesia: 50 mg/mL quetamina - dose 10 mg/kg foram administradas visando a morte fetal. Os fetos foram removidos durante a ovariohisterectomia e transportados até o laboratório em tubos Falcon de 50 mL contendo meio Eagle modificado por Dulbecco com a mistura de nutrientes de

Ham (F12) (DMEM/F12 - Sigma-Aldrich) com 5% de solução antibiótica contendo 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich). Amostras do intestino delgado correspondentes à região jejuno-ileal (~5 cm), coletadas assepticamente por incisão da cavidade abdominal dos fetos, foram alocadas em placas de Petri contendo solução tampão fosfato salino (PBS) estéril com 10% de solução antibiótica contendo 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina a temperatura de 4°C. Após lavagem com PBS, as frações de tecido foram transferidas para outra placa de Petri contendo solução de dissociação não enzimática (pH 7,2) constituída de 1 mM de ácido etilenodiamino ácido tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1 mM de etilenoglicol bis(2-aminoetileter) ácido tetra-acético (EGTA) (Sigma-Aldrich), 0,5 mM de ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich) e 10% de solução antibiótica. Os tecidos foram fragmentados (os menores possíveis - cerca de 3 mm²) com bisturi em solução de dissociação e submetidos à agitação por 20 min à temperatura ambiente em agitador orbital para promover a melhor dissociação do tecido e colocados em shaker (Perreault e Jean Francois, 1996; Macartney e cols., 2000; Aldhous e cols., 2001; Rusu e cols., 2005). Em seguida, os fragmentos de tecido foram coletados e transferidos para frascos de cultura de 25 cm², previamente revestidos com 0,01% de colágeno (Sigma-Aldrich), contendo meio DMEM-F12 suplementado com 1% de solução antibiótica contendo 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, 1 mM de glutamina, 5% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF; Sigma-Aldrich) (Sanderson e cols., 1996; Aldhous e cols., 2001). Algumas modificações na composição do meio foram introduzidas para o cultivo de enterócitos, sendo acrescentado 0,1% de insulina humana (Humulin N - Lilly, Indianapolis), 100 nM de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 1% de aminoácidos não essenciais 100x (Life Technologies), e 1 µg/ml de sal de sódio 3,3', 5-triiodo-L-thyronina (T3) (Sigma-Aldrich) (Desmarests e cols., 2013). Dando prosseguimento ao cultivo das células, a solução enzimática contendo células em suspensão foi transferida assepticamente para tubos Falcon de 15 mL e centrifugada por 10 min a 2700 rpm. O sedimento foi ressuspenso em meio nutritivo para enterócitos e uma alíquota celular foi separada e incubada com 0,4% azul de Tripán (Sigma-Aldrich) em PBS para quantificação com base na viabilidade celular. O número total de células/mL foi determinado após quantificação em câmara de Neubauer e as células semeadas na densidade de 1,5 10⁶ células/mL em frascos de culturas de 25 cm² ou 10⁵ de células por poço em placas

de 24 poços, respectivamente, previamente revestidas com 0,01% colágeno. As culturas foram mantidas em meio DMEM-F12 suplementado em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e o meio nutritivo renovado a cada três dias.

3.3 *Toxoplasma gondii*

A cepa avirulenta ME49 de *T. gondii*, (tipo II, cistogênica), isolada originalmente de músculo de carneiro pelo grupo de Remington (1965), foi selecionada devido à sua capacidade de encistamento e reprodução da infecção crônica. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli do Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou - Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil.

3.3.1 Isolamento de cistos teciduais (Freyre, 1995; Popiel e cols., 1996)

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (15-18 g) foram infectados por via intraperitoneal com cerca de 50 cistos teciduais. Após 4-8 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia pela administração via intraperitoneal de cloridrato de ketamina (300 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (30 mg/kg). Os cérebros foram retirados por método cirúrgico, sob condições assépticas em cabine de segurança biológica classe II, e imersos em PBS a 4°C e seguida de três lavagens no mesmo tampão para retirada de células sanguíneas. Em seguida, os cérebros foram fragmentados, com o auxílio de uma tesoura, e macerados em PBS por sucessivas passagens dos fragmentos em agulhas de 18 e 23 G de calibre. Duas alíquotas de 20 µl da suspensão do macerado de cérebro foram diluídas em PBS e colocadas sob lâmina de microscopia e montadas com uma lamínula de 24 x 32 mm. A leitura total da lâmina foi realizada ao microscópio óptico com objetiva e ocular de 10X para obtenção do número total de cistos.

3.3.2 Purificação dos cistos (Freyre, 1995; Popiel e cols., 1996)

A suspensão do macerado de cérebro, contendo os cistos tissulares, foi passada por uma peneira de aço inox com malha de 60 “mesh” (Cell dissociation sieve-tissue grinder kit; Sigma-Aldrich) para retirada de pequenos fragmentos de

tecido e *debris* celulares. Após este procedimento, a suspensão de cistos semipurificada foi distribuída igualmente em tubos de 15 mL, ressuspensão para o volume final de 3 mL de PBS e centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, corresponde ao macerado de 1 cérebro, ressuspensão em 2,5 mL de DMEM/F12 contendo 25% de Dextran (w/v) e em seguida, centrifugado por 10 min a 3500 rpm. Ao final da purificação, os cistos foram sedimentados na fase inferior e os *debris* celulares nas fases superiores da solução. Os sedimentos contendo os cistos foram ressuspensos em 3 mL de DMEM/F12, centrifugados por 10 min a 1500 rpm, para retirada do Dextran, e então, ressuspensos em 3 mL de DMEM/F12. Duas alíquotas de 20 µl da suspensão de cistos purificados foram colocadas entre lâmina de microscópio e lamínula (24 x 32 mm) e o número de cistos determinado pela quantificação da área total da lamínula em microscópio óptico com objetiva de 10X.

3.3.3 Obtenção de bradizoítos (Jacobs e cols., 1960; Dubey, 1998c)

Para o isolamento dos bradizoítos intracísticos, os cistos purificados foram incubados por 1-5 min a 37°C em solução aquosa de pepsina ácida (0,052% de pepsina (atividade 1:10.000), 1,4% de ácido clorídrico e 1% de cloreto de sódio) na proporção pepsina ácida:cistos de 1:5 (v/v) em PBS sob agitação, visando o rompimento da parede cística e liberação das formas bradizoítas. Durante a incubação com pepsina, a cada minuto uma alíquota da solução era observada em microscópio óptico de campo claro para monitorar o rompimento da parede cística e evitar exposição excessiva dos bradizoítos à enzima. Decorrido o tempo necessário, a atividade enzimática foi neutralizada com solução de 1% carbonato de sódio. A suspensão contendo os bradizoítos foi lavada em meio DMEM/F12 suplementado de 1% de solução antibiótica contendo 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 5% de SFB (Life Technologies) e centrifugada por 10 min a 250 g. O número total de parasitos/mL foi determinado pela quantificação em câmara de Neubauer após diluição (1:10) da suspensão parasitária em solução de 0,4% azul de Tripan em PBS, para determinação da viabilidade celular, e imediatamente os parasitos foram usados nos experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira.

3.4 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. Após 24 h de interação, as culturas foram lavadas para remoção dos parasitos livres no sobrenadante e mantidas em meio nutritivo para enterócito (DMEM/F12 suplementado). Os ensaios de interação foram realizados nas proporções de 1:20, 1:50 e 1:100 (parasito-célula hospedeira) durante períodos que variaram de 1 a 9 dias pós-infecção e durante esse período a concentração de SFB foi de 1% de acordo com a sugestão de Worliczek e cols., 2013). Após lavagem em PBS, as amostras controles (não infectadas) e as infectadas foram fixadas e processadas de acordo com os ensaios a serem desenvolvidos.

3.5 Coloração pelo Giemsa

Monocamadas confluentes de CEIF, cultivadas em lamínulas de vidro (13 mm), foram submetidas à interação com bradizoítos de *T. gondii*. Nos diferentes intervalos de interação (24 a 96 h), as culturas foram lavadas em PBS e fixadas em solução de Bouin por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas em etanol 70% seguido de lavagem em água destilada coradas por 60 min em solução de 10% Giemsa diluída em PBS. Após a coloração, as lamínulas contendo a monocamada celular foram desidratadas em série de acetona-xilol (acetona 100% duas vezes, acetona 70% / xilol 30%, acetona 50% / xilol 50%, acetona 30% / xilol 70%, xilol 100% duas vezes) e montadas em resina Permount (Fischer Scientific).

3.6 Análise Ultraestrutural

3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Monocamadas de CEIF, cultivadas em lamínulas de vidro, foram infectadas com bradizoítos de *T. gondii* por 1 a 7 dias e fixadas por 30 min a temperatura ambiente em 2,5% de glutaraldeído (GA) diluído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl₂ (pH 7,2). Após a lavagem, no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas por 30 min a temperatura ambiente em 1% de

tetróxido de ósmio (OsO₄) diluído em 0,1M de tampão cacodilato contendo 3.5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl₂ (pH 7,2), desidratadas em série crescente de acetona (30-100%) e secas pelo método de ponto crítico utilizando o aparelho Tousímio Autosamdri 805 A. As lamínulas foram montadas com cola de prata em suportes de alumínio e revestidas com uma fina camada de 20 nm de ouro no metalizador Cressington sputter coater 108. As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV com aceleração de voltagem de 15 kV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz (IOC - Fiocruz).

3.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

CEIF infectadas (ou não) com *T. gondii* por períodos de 24 h até 9 dias foram fixadas por 1 h a 4°C com 2,5% GA diluído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl₂ (pH 7,2). Após a fixação, as culturas foram lavadas no veículo do fixador e pós-fixadas por 30 min à temperatura ambiente (cerca de 22°C) em 1% OsO₄ em tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl₂ (pH 7,2). Após lavagem, as células foram destacadas do substrato, com auxílio de um raspador de células (*rubber policeman*), a 4°C e a suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 10,000 g. Posteriormente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50 a 100%) e infiltradas em resina epoxi (Poly/Bed® 812 - Polysciences). Cortes ultrafinos foram obtidos no ultramicrotomo Reichert Ultracut E e recolhidos em grades de cobre de 300 “mesh”. O material foi contrastado 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.

4. RESULTADOS

4.2 Cultura primária de enterócitos de felídeos

4.2.1 Estabelecimento e análise morfológica das culturas

A dissociação não enzimática do intestino delgado de fetos jovens de felino permitiu o isolamento de enterócitos. Este procedimento foi crucial para o elevado rendimento e viabilidade celular, alcançando aproximadamente $90 \pm 5\%$ de células viáveis. Imagens *in situ* por microscopia de contraste de fase mostram as culturas estabelecidas a partir de fragmentos do tecido intestinal, de onde as células migram após 24 h de cultivo (Fig. 4.1A), ou a partir de células isoladas que proliferam ao redor do foco de adesão, formando pequenas ilhotas (“clusters”) de células na cultura com 48 h de cultivo (Fig. 4.1B). No período de 72-96 h, estas células proliferaram e preencheram gradativamente a superfície para formação da monocamada (Fig. 4.1C e D). Objetivando uma maior reprodutibilidade do fenótipo do tecido epitelial intestinal foi introduzido o colágeno como matriz extracelular, a fim de estimular maior alinhamento e a polarização das células. Assim, o revestimento dos substratos, quer nas superfícies de plástico ou de vidro (lamínulas), com colágeno resultou na maior capacidade de adesão das células e maior estímulo à diferenciação e alinhamento (Fig. 4.2A e B). Sob essas condições, no período de 48 h as culturas apresentavam organização e características epiteliais, como alinhamento e grande espalhamento celular (Fig. 4.2B).

Subculturas de enterócitos foram obtidas até pelo menos a quinta passagem, com predominância de células com características fenotípicas de enterócitos, tais como, grande expansão citoplasmática, justaposição e núcleos volumosos, como observado nas culturas *in situ* após 120-144 h de cultivo (Fig. 4.3A-C). Estas culturas foram mantidas por até 15 dias e progressivamente reduziram sua taxa de proliferação até a cessação da divisão celular e morte.

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura mostrou enterócitos de felinos cultivados por 72 h apresentando grande expansão celular, núcleo bastante volumoso, projeções de membrana finas e longas, além de pontos de adesão focal ao substrato (Fig. 4.4A). Numa visão geral em menor aumento pode-se observar os contatos célula-célula indicativo da formação de áreas de especialização (Fig. 4.4B).

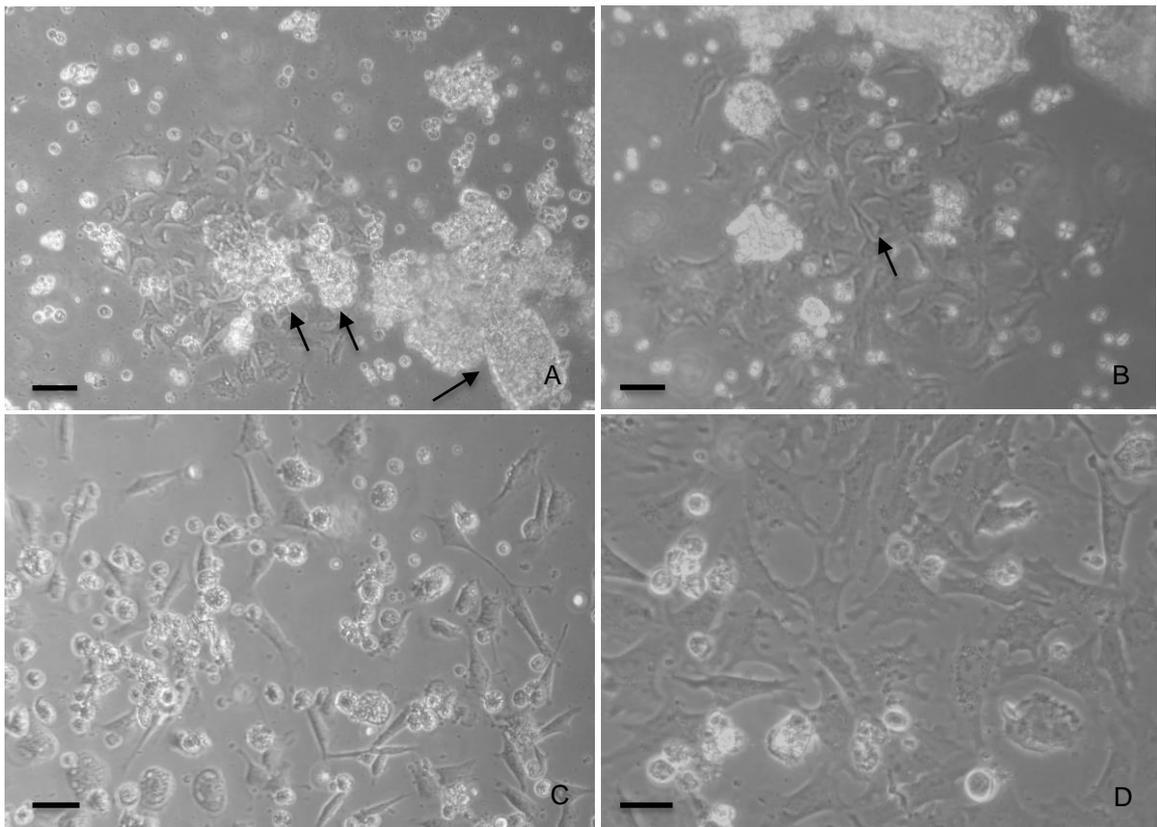


Figura 4.1: Aspectos morfológicos *in situ* das culturas primárias de enterócitos de felino por microscopia de contraste de fase. (A) Migração celular a partir de explante intestinal e início de formação de monocamada com 24 h de cultivo. (B) Crescimento da cultura a partir de células individualizadas formando grupos de células com 48 h. (C e D) Monocamada de células formada a partir do foco de adesão com 72-96 h. Barras: 20 μ m

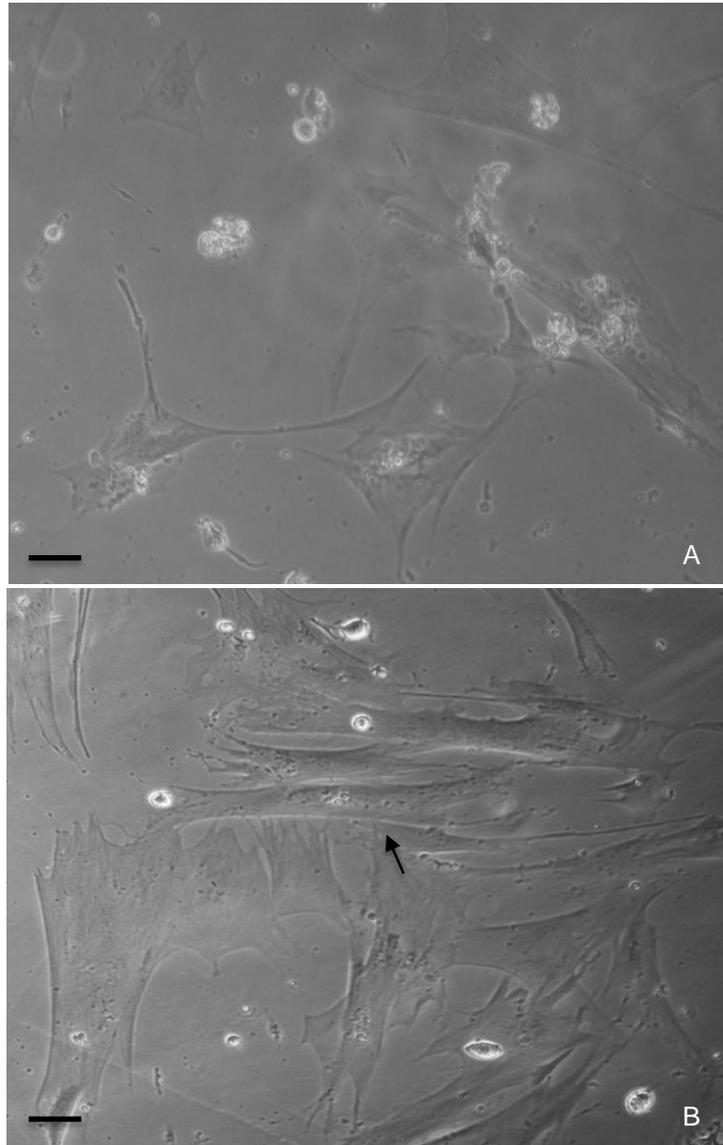


Figura 4.2: Aspectos morfológicos *in situ* das culturas primárias de enterócitos de felino por microscopia de contraste de fase. (A) Células cultivadas em superfície sem colágeno após 48 h mostram menor adesão ao substrato. (B) Substratos revestidos com colágeno resultou na maior capacidade de adesão das células e maior estímulo à diferenciação e alinhamento (setas). Barras: 20 µm

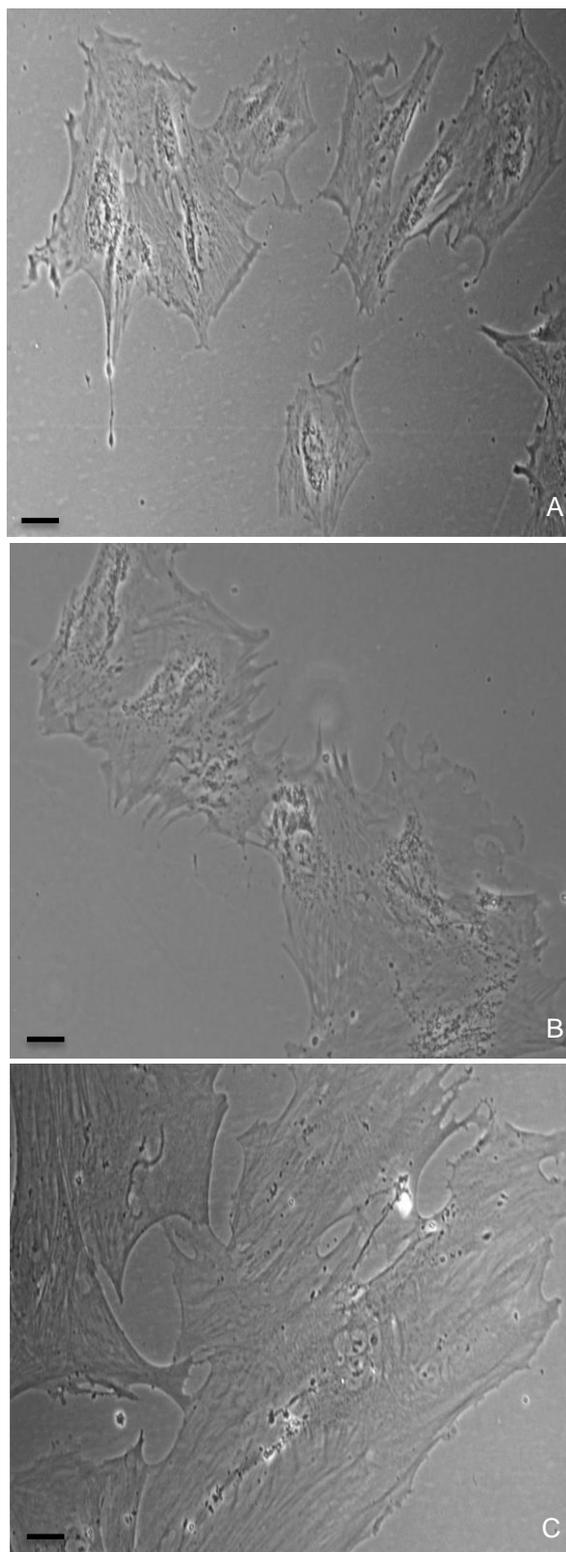


Figura 4.3: Aspectos morfológicos *in situ* das culturas primárias de enterócitos de felino por microscopia de contraste de fase. (A-C) Subculturas apresentam predominância de células com características fenotípicas de enterócitos com grande expansão das células, justaposição e núcleos volumosos após 120-144 h de cultivo. Barras: 20 μ m

A análise de cortes ultrafinos de CEIF por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que as células em cultura mantêm as características fenotípicas ultraestruturais típicas de células epiteliais intestinais (Fig. 4.5A-E). A partir de 96 h de cultivo as células apresentaram grande expansão do seu citoplasma e volume nuclear com a cromatina dispersa além de retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos (Fig. 4.5A e B). Ribossomos e mitocôndrias numerosos, além de fibras de estresse, visualizadas logo abaixo da membrana, foram observadas nas CEIF (Fig. 4.5A e B). A diferenciação celular pode ser observada a partir de 96 h pela formação de microvilosidades em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 4.5C-E). A Figura 4.5C mostra projeções da membrana em diferentes áreas da superfície da célula, enquanto nas Figuras 4.5D e E as células se encontram em estágio mais avançado de diferenciação adquirindo uma borda de escova – as microvilosidades, curtas e numerosas, concentradas na região apical, característica do tecido epitelial intestinal. Com 10 dias de cultivo pode-se observar alinhamento e polarização bem definidos, um grande número de microvilosidades no pólo apical e áreas de contato célula-célula e interdigitações laterais (Fig. 4.6A-D), constituindo regiões de especialização de membrana, as junções intercelulares (Fig. 4.6C e D). Na área do complexo juncional são identificadas a zônula oclusiva, zônula aderente e desmossomos (Fig. 4.6D) confirmando assim a natureza epitelial das células em cultura.

4.2.2 Aspectos morfológicos da infecção de enterócitos com bradizoítos de *T. gondii*

4.2.2.1 Ciclo lítico

Na busca de evidências da reprodução do ciclo enteroepitelial de *T. gondii* no modelo de cultivo de enterócitos de felinos *in vitro*, foi possível acumular dados de que neste nicho celular, como em alguns tipos celulares nucleados, ocorre (i) a conversão de bradizoítos em taquizoítos, (ii) o estabelecimento do ciclo lítico, (iii) a cistogênese e (iv) estágios do parasito compatíveis com algumas etapas do processo da esquizogonia descritas no sistema *in vivo*, como a seguir.

O monitoramento das culturas infectadas com bradizoítos de *T. gondii*, na relação 1:20, por microscopia de contraste de fase *in situ* mostrou, após incubação com parasitos por 48-72 h, a presença de células com número variável de parasitos como produto da endodiogenia (Fig. 4.7A e B). A observação destas culturas *in situ* com 96 h apontaram

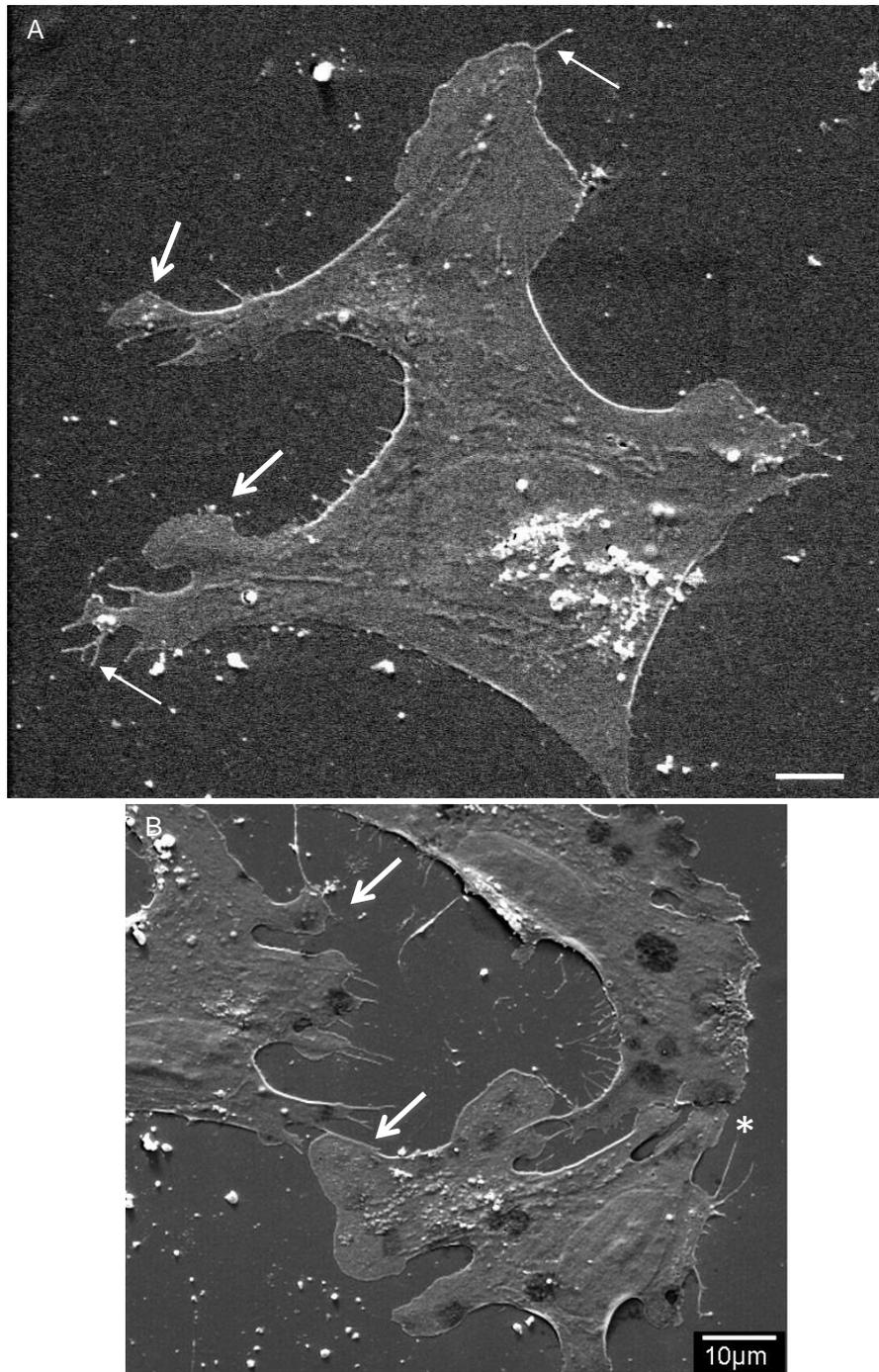


Figura 4.4: **Caracterização morfológica de culturas de enterócitos de felinos.** (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando célula cultivada por 72 h com grande volume, projeções da membrana plasmática finas e longas (seta fina) e pontos de adesão focal ao substrato (seta grossa). (B) Após 96 h são observadas grandes áreas das membranas celulares em contato, indicativo da formação de áreas de especialização de membrana (*). Barra A:10 µm

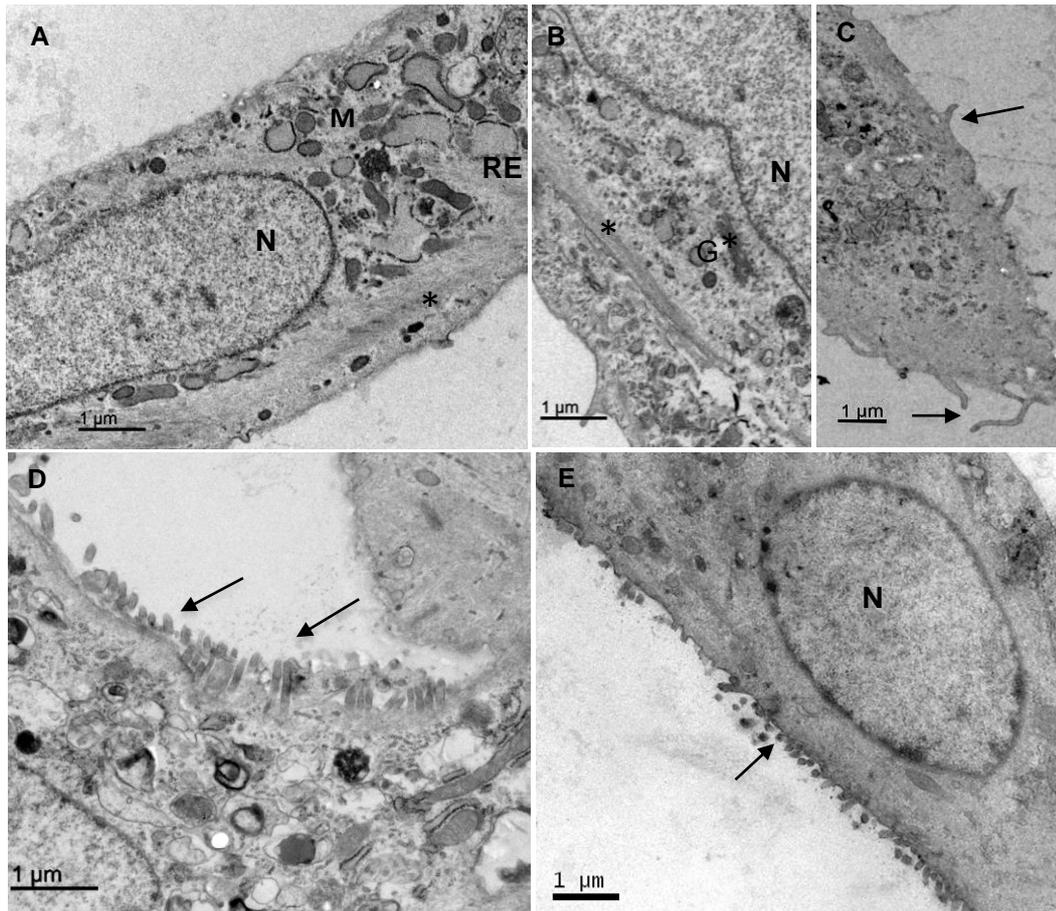


Figura 4.5. Caracterização morfológica de cultura de enterócitos de felinos. (A) Célula após 96 h de cultivo apresentam grande volume celular e nuclear, retículo endoplasmático curto (RE), cromatina nuclear dispersa, mitocôndrias (M) e ribossomos numerosos. (B) Golgi (G) e fibras de estresse logo abaixo da membrana (*). (C) Enterócitos em processo de diferenciação celular com expansões da membrana e formação de microvilosidades finas e longas (setas finas). (D e E) Células já diferenciadas e polarizadas mostrando microvilosidades curtas na região apical (setas finas). Núcleo (N)

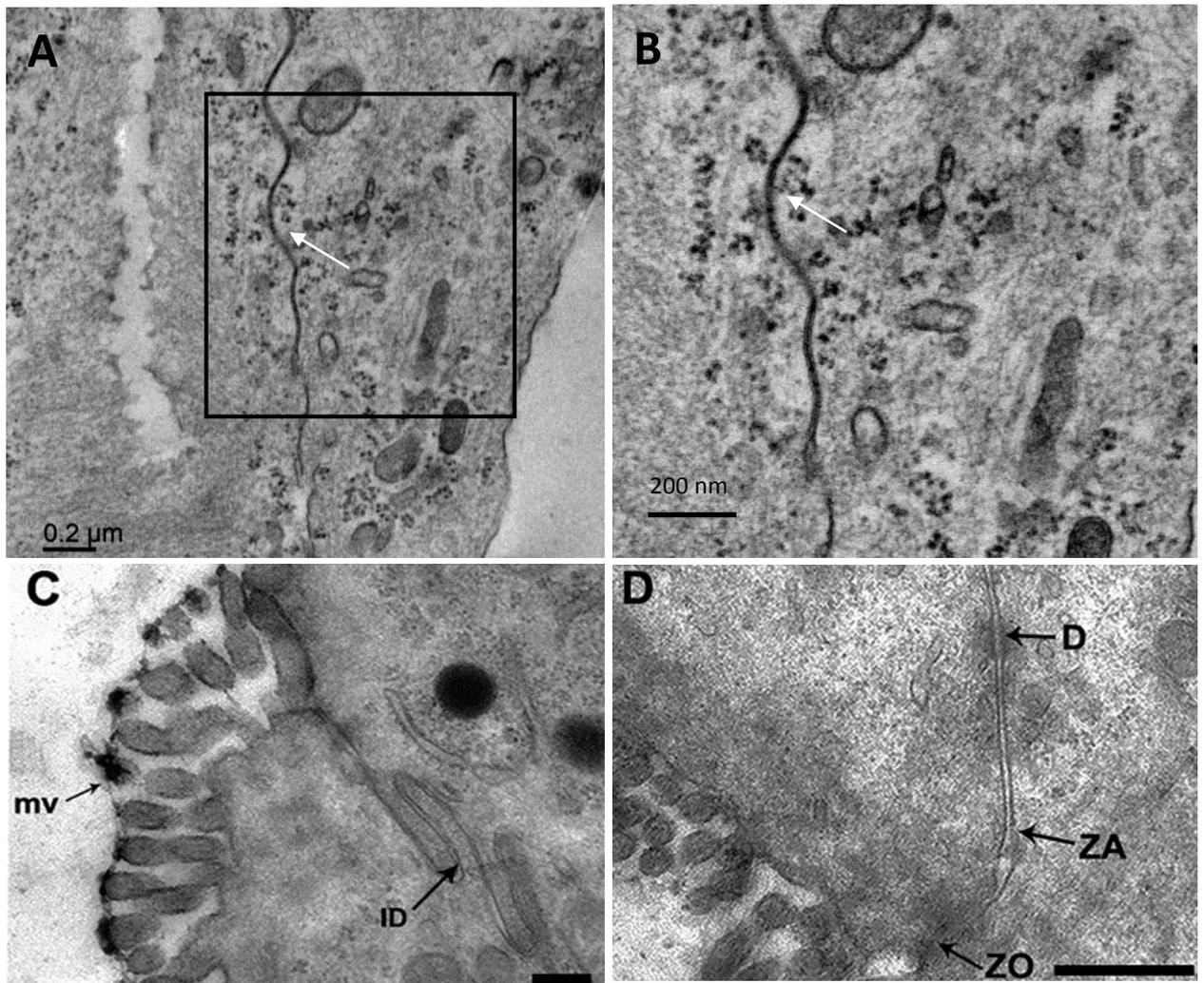


Figura 4.6. Caracterização morfológica de cultura de enterócitos de felinos com 10 dias de cultivo. (A) Área de contato célula-célula (seta) formando região de especialização da membrana, as junções intercelulares (setas). (B) Detalhe da região vista em A. (C) Enterócitos mais diferenciados apresentando microvilosidades (mv), interdigitação lateral (ID) de membranas; (D) Complexo juncional constituído de junções celulares: zônula oclusiva (ZO); zônula aderente (ZA) e desmossomos (D) Barras: (C) 0,5 μm; (D) 0,2 μm

imagem sugestiva de rompimento da membrana do VP e a migração dos parasitos no citoplasma da célula em direção à membrana plasmática (Fig. 4.7C). O estabelecimento do ciclo lítico completo pode ser observado na Figura 4.7D com o escape de inúmeros parasitos dos enterócitos para o meio extracelular. Com 96 h de interação vacúolos de grande volume contendo muitos parasitos foram observados com formato alongado, apresentando características morfológicas compatíveis com formação de cistos indicativo de que a cistogênese também ocorre em enterócitos (Fig. 4.7E).

As figuras 4.8 e 4.9 mostram imagens de culturas de enterócitos coradas pelo Giemsa no curso temporal de 48 e 96 h de interação. Vacúolos em processo franco de divisão celular por endodiogenia, após 48 h de infecção, contendo rosetas ou desorganizados formando várias duplas de parasitos (Fig. 4.8A). A Figura 4.8 demonstra uma única célula repleta de parasitos em processo avançado de endodiogenia com várias rosetas. Ainda, com 48 horas de interação parasito-célula hospedeira pode-se observar no VP o processo de divisão celular dos parasitos ao lado de células contendo parasitos unitários, produto de infecção recente decorrente do rompimento de células que já concluíram o ciclo lítico, indicando também que enterócitos infectados não são refratários a novas infecções. A falta de sincronização da invasão dos parasitos em cultura permite a observação de diferentes estágios de desenvolvimento intracelular de *T. gondii*. Com 96 h de interação parasito-célula predomina a presença de infecções múltiplas nas células em processo ativo de endodiogenia (Fig. 4.9A-B) e concluída a divisão celular os parasitos tornam-se individualizados e próximos à membrana da célula hospedeira visando o egresso.

Culturas primárias de enterócitos infectadas com bradizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* (proporção 1:20 parasito - células hospedeiras) foram analisadas por MET após períodos que variaram entre 48 h até 9 dias de interação. Após a invasão da célula hospedeira, o parasito localiza-se no interior do VP no citoplasma da célula hospedeira, onde permanece até seu egresso. A falta de sincronismo de invasão durante a interação de *T. gondii* com a célula hospedeira limita uma avaliação temporal destes processos e, por conseguinte, o seu destino intracelular. Diante deste fato, optamos por analisar esses eventos definindo alguns parâmetros que pudessem nos guiar para um melhor entendimento da dinâmica destes processos intracelulares baseado na identificação ultraestrutural dos estágios infectivos, nas diferentes etapas

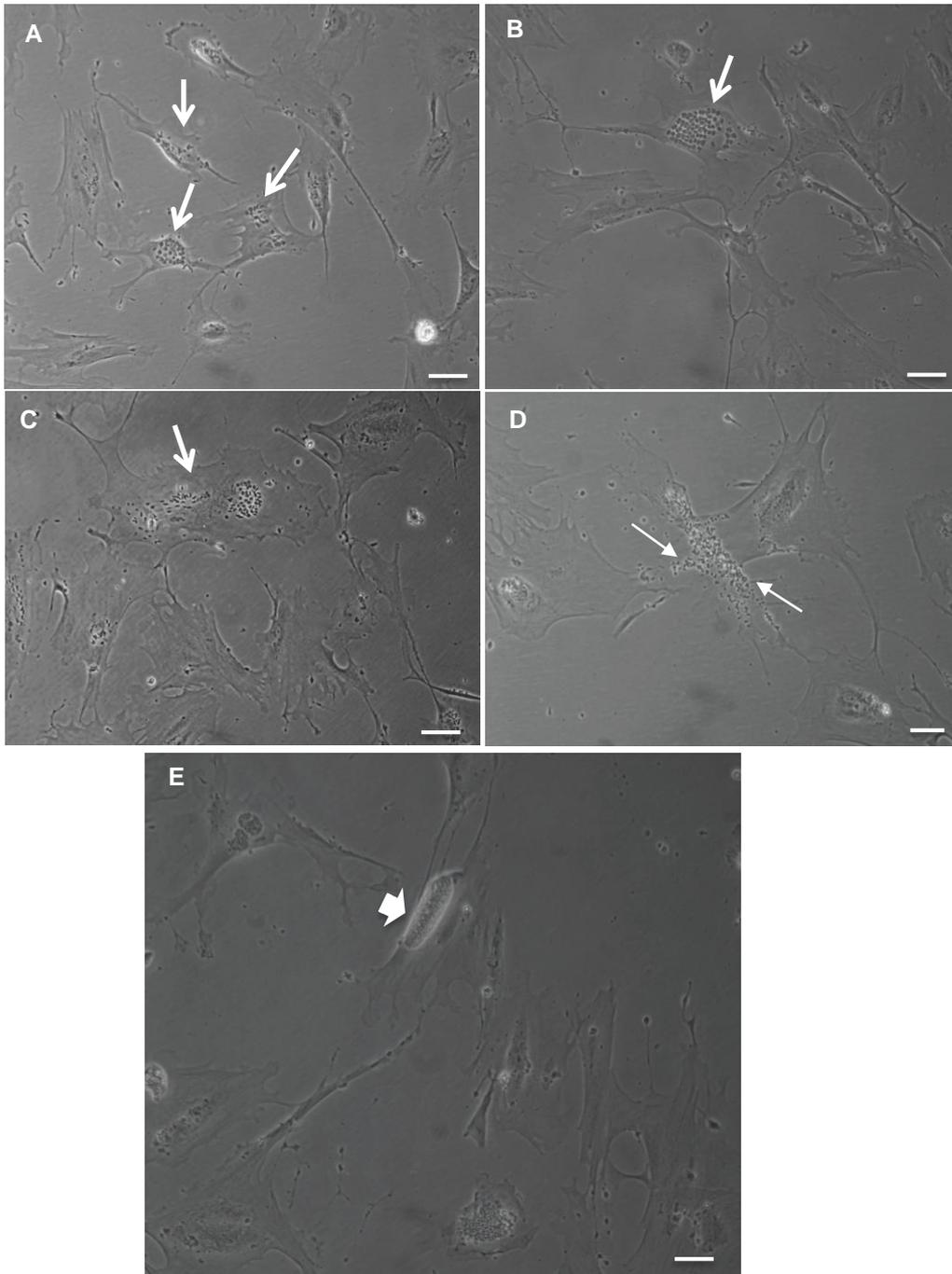


Figura 4.7. Microscopia de contraste de fase de enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii*, na proporção 1:20 parasito-célula, *in situ*. (A) Infecção de 48 h e (B) 72 h. Presença de células com vacúolos contendo vários parasitos como produto da endodiogenia (setas grossas). (C e D) Infecção de 96 h. (C) Célula com parasitos no citoplasma, devido a ruptura do VP, e sua migração para a membrana do enterócito para escape (seta grossa). (D) Célula com ciclo lítico concluído com a liberação dos parasitos no meio extracelular (setas finas). (E) Célula infectada (96 h) contendo estrutura cisto-símile indicativo de ocorrência de cistogênese em enterócitos (seta larga e curta). Barras: 10 μ m

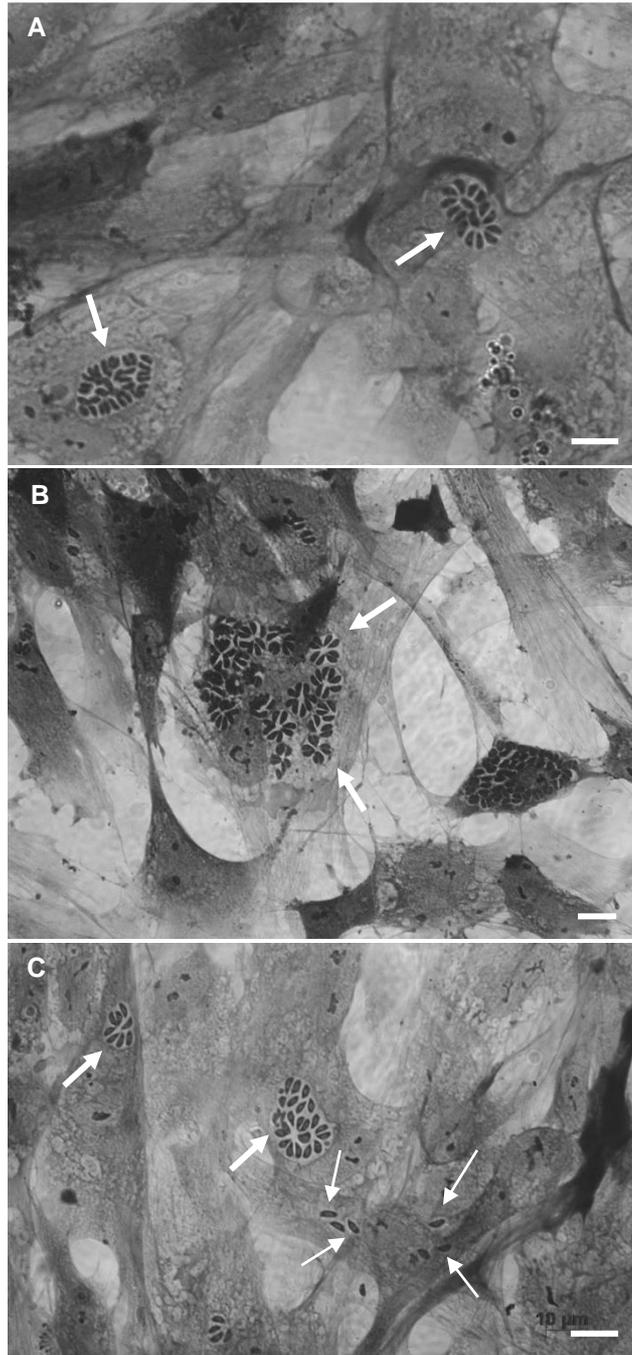


Figura 4.8: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção). (A-C) Presença de parasitos em ativo processo de divisão celular por endodiogenia com formação de rosetas (setas grossas). (C) Algumas células contém vários vacúolos com um único parasito (setas finas), produto de reinfeção pela liberação de parasitos que concluíram o ciclo lítico. Barras: 10 μm

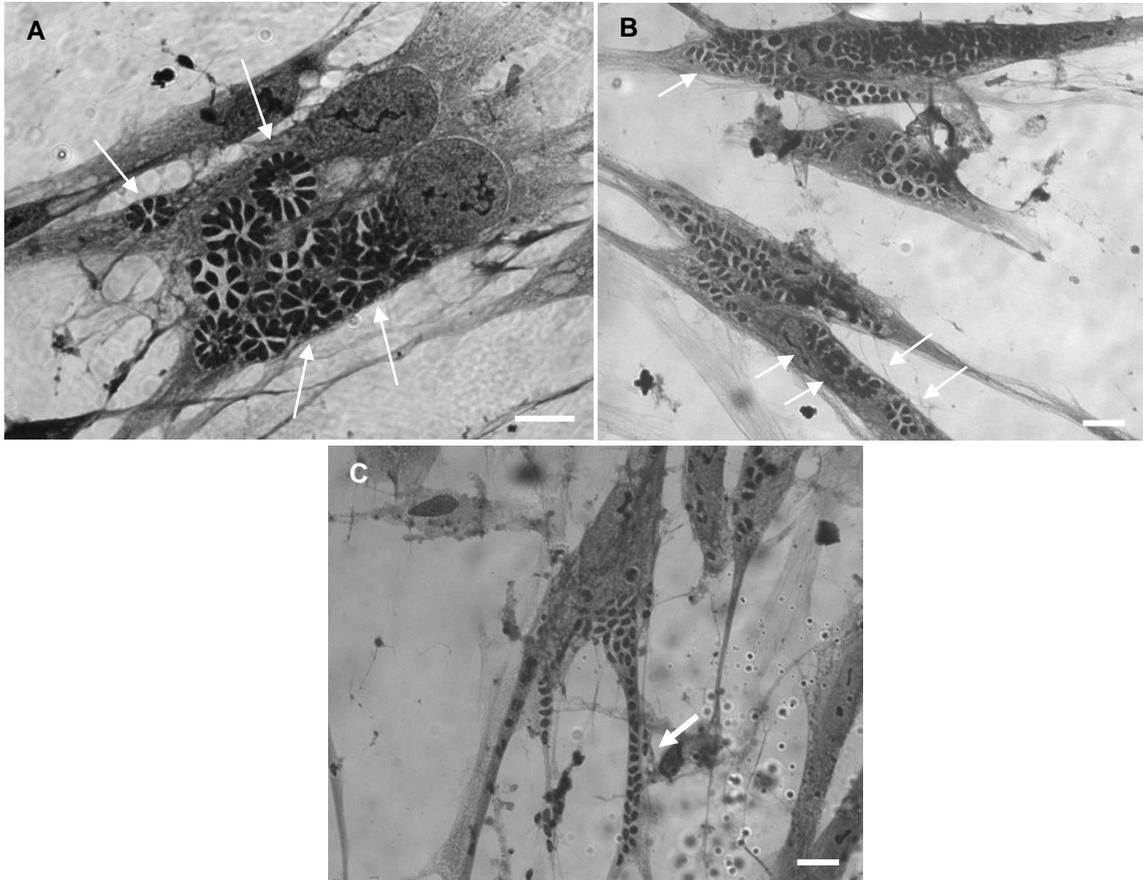


Figura 4.9: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (96 h de infecção). (A-B) Presença de parasitos em ativo processo de divisão celular com formação de rosetas (setas finas). (C) Célula em final do processo de endodiogenia com parasitos individualizados próximos à membrana para egresso da célula hospedeira (seta grossa). Barras: 10 μ m

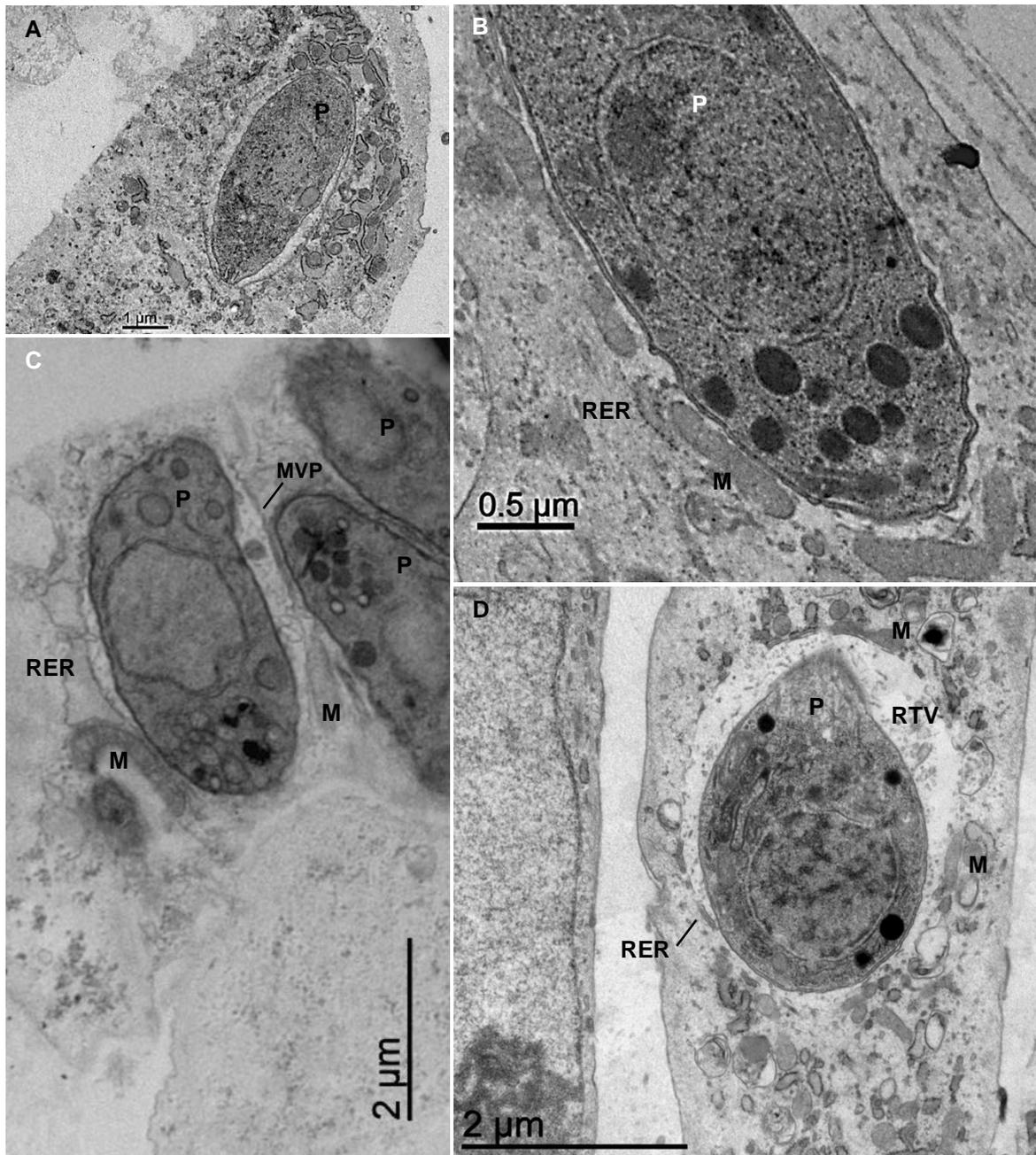


Figura 4.10: Ultraestrutura de culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção). (A, B e D) Células com vacúolos contendo um único parasito (P) indicativo de infecção recente ou (C) infecção múltipla com um parasito em vários VP na mesma célula. (A-D) Recrutamento de mitocôndrias (M) e perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) para o entorno da membrana do vacúolo parasitífero (MVP). Observa-se a rede tubulovesicular (RTV) no interior do vacúolo parasitífero. (B e D) Mostram detalhes da distribuição radial de mitocôndrias circundando o VP associadas diretamente à MVP ou estabelecendo esse contato mediado pelo RER.

do ciclo celular do parasito e ainda, nas alterações morfológicas do VP decorrentes do desenvolvimento do ciclo lítico, do encistamento e dos estágios que correspondessem ao desenvolvimento, mesmo que parcial, do ciclo entérico de *T. gondii* nos hospedeiros definitivos, os felinos.

A análise de centenas de imagens de cortes ultrafinos de culturas infectadas mostrou alguns aspectos da resposta celular à presença do parasito. Após 48 h de infecção da cultura de enterócitos com bradizoítos de *T. gondii* foi comum observar células com apenas um VP contendo um único parasito, indicativo de infecção recente (Fig. 4.10A, B e D), ou infecção múltipla com vários VP contendo um parasito na mesma célula, muito provavelmente decorrente de parasitos provenientes da lise de células infectadas (Fig. 4.10C). Nota-se que a diferenciação de bradizoítos para taquizoítos já tinha sido concluída devido à ausência de grânulos de amilopectina nos parasitos (Fig. 4.10A-D). Estes VP contendo um único parasito mostram o recrutamento de mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) para o entorno da MVP (Fig. 4.10A-D). As Figuras 4.10B-D mostram detalhes da distribuição radial de mitocôndrias circundando o VP associadas diretamente à MVP ou estabelecendo esse contato mediado pelo RER (Fig. 4.10B-D). A interação de RER à MVP se dá via sua face lisa estando a face rugosa (com ribossomos) voltada para o citoplasma da célula hospedeira (Fig. 4.10B-D). Vacúolos contendo um único parasito apertado apresentam uma rede túbulo-vesicular (RTV) pouco desenvolvida (Fig. 4.10A-C) e em VP mais frouxos, a RTV é mais proeminente (Fig. 4.10D). A divisão celular de *T. gondii* ocorre por endodiogenia e uma sequência de imagens mostra as diferentes etapas deste processo em enterócitos por MET. No início da divisão, dois complexos apicais se desenvolvem no interior do parasito, à semelhança de conóide rudimentar, como visto na Figura 4.11A. O núcleo assume o formato de ferradura durante a sua replicação, a célula aumenta de volume, o complexo interno se estende a partir destas estruturas e as organelas duplicam (Fig. 4.11B e C). O núcleo e demais organelas se dividem entre as duas células filhas em formação (Fig. 4.11D) que ao término, as células filhas serão envoltas pela membrana plasmática da célula mãe até a cisão completa. As células permanecem unidas por um corpo residual na extremidade posterior (Fig. 4.12A). Os parasitos resultantes das divisões celulares organizam-se na forma de rosetas dentro do VP e no centro destas rosetas localiza-se o corpo residual frequentemente redondo que mantém os parasitos ligados pela extremidade posterior (Fig. 4.12B-D). Assim, após

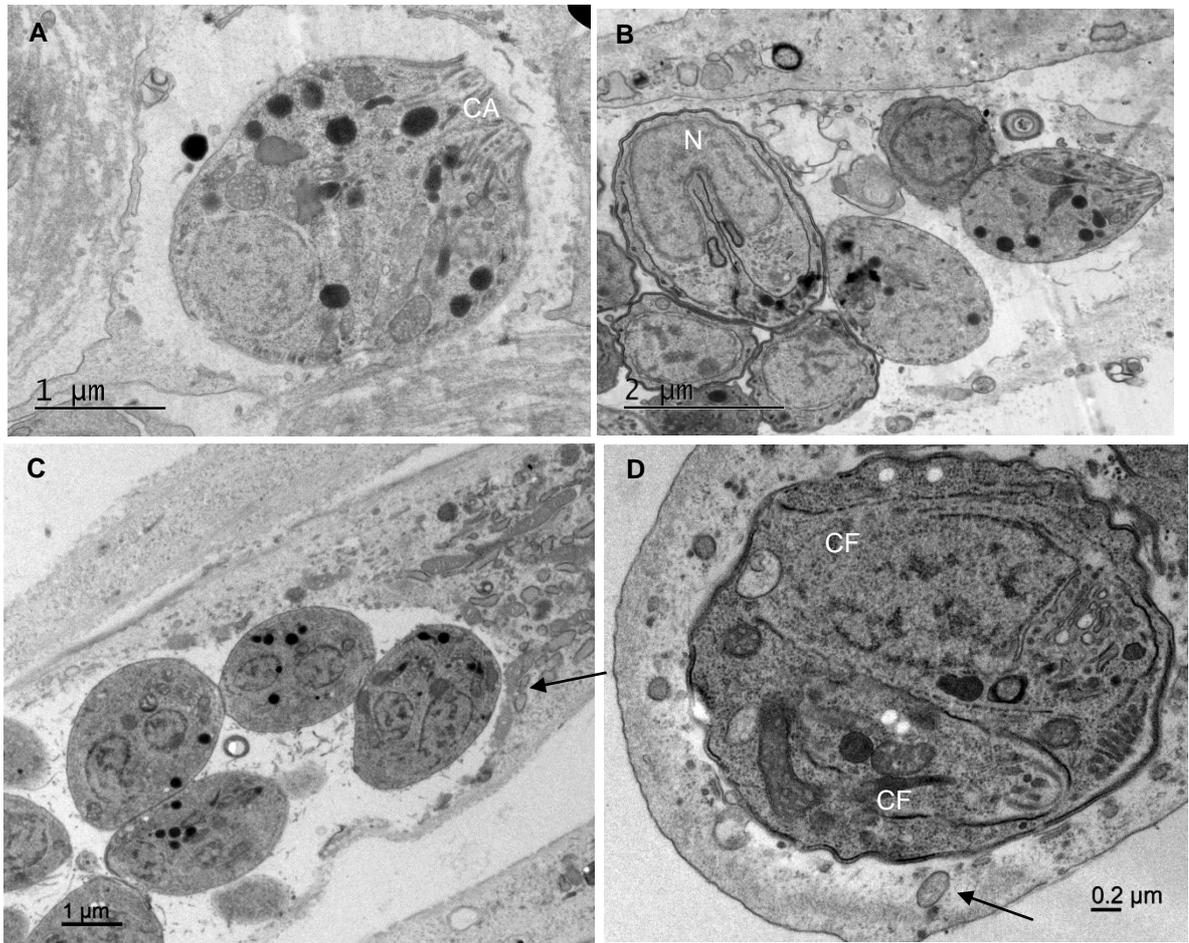


Figura 4.11: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção). Processo de divisão do parasito por endodiogenia. (A) No início da divisão, dois complexos apicais (CA) se formam no interior da célula. (B) O núcleo (N) adquire o formato de ferradura. (C) O complexo membranar interno se estende com aumento do volume celular e as demais organelas duplicam. (D) Em seguida, núcleo e organelas se dividem entre as duas células filhas (CF) em formação. Organelas de enterócitos se mantêm associados à MVP (setas).

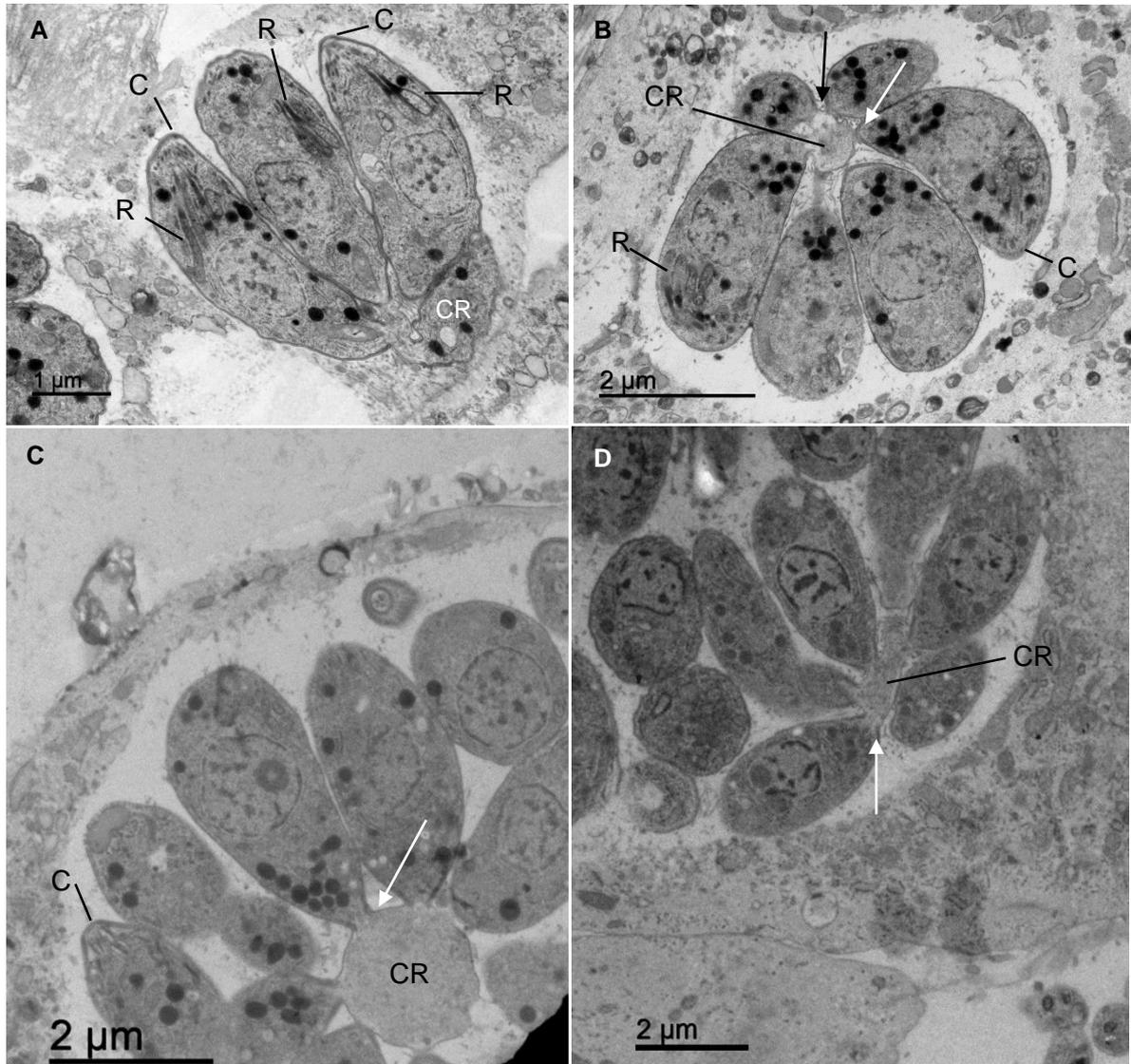


Figura 4.12: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (48 h de infecção). (A-D) Organização intravacuolar durante a divisão celular de taquizoítos. (A) Ao fim desse processo restam duas células filhas e um corpo residual (CR). (B-D). Os parasitos resultantes das divisões celulares organizam-se na forma de rosetas dentro do VP. No centro da roseta identifica-se o CR como uma estrutura redonda que se liga às extremidades posteriores (setas) dos parasitos em proliferação. Durante todo este processo a associação de organelas de enterócitos à MVP é mantida. R - Róptria; C -

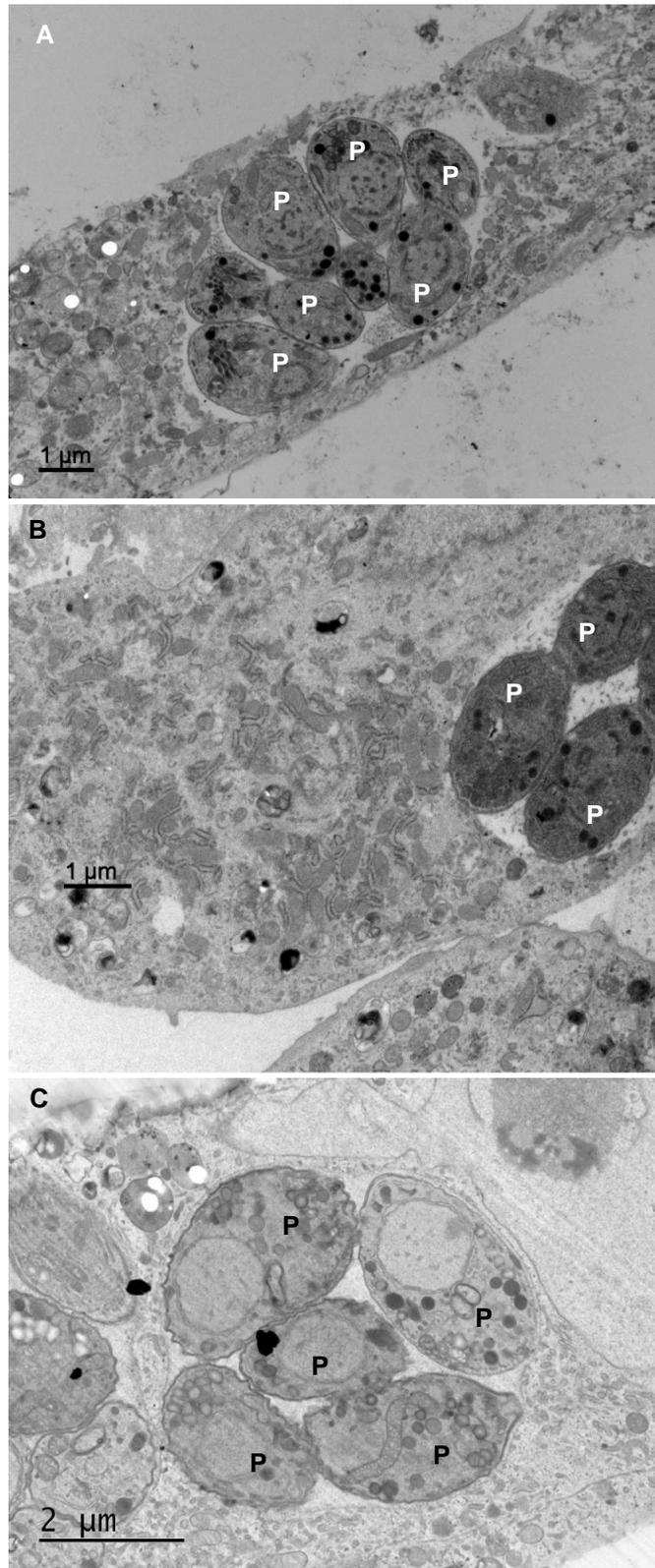


Figura 4.13: Culturas de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (72 h de infecção). (A-C) Parasitos (P) individualizados no interior do VP após conclusão da endodiogenia. Estes parasitos estão aptos para o egresso da célula hospedeira e capazes de infectar outras células. Durante todo este processo a associação de organelas de enterócitos é mantida.

sucessivas multiplicações, concluída a endodiogenia, o corpo residual é consumido pelos próprios parasitos que se individualizam, como pode ser observado na Figura 4.13A-C e se preparam para o egresso da célula hospedeira, sendo capazes de infectar outras células. Durante todo este processo ocorre a associação de organelas de enterócitos ao VP (Fig. 4.10A-D; 4.12A-D; 4.13A-C).

4.2.2.2 CISTOGÊNESE

Simultaneamente ao desenvolvimento do ciclo lítico, a partir do período de 72 h de interação parasito-célula, foi frequente, como observado por microscopia óptica em células coradas pelo Giemsa, VP de grande volume, com inúmeros parasitos, que apresentavam características morfológicas compatíveis com formação de cistos (Fig. 4.14A-E). Reforçando a sugestão da cistogênese se estabelecendo em enterócitos, no entorno dessas estruturas pode-se observar um halo e uma espessa membrana, à semelhança da morfologia da parede cística (Fig. 4.14B-E).

A ultraestrutura nas Figuras 4.15A, 4.16A e B, 4.17A-C e 4.18A-C mostra enterócitos, com 6-9 dias de infecção, onde se observam VP com a membrana modificada. Estes VP apresentam a membrana mais espessa, constituída de uma unidade de membrana e na sua face interna, uma região com maior eletrondensidade, de aspecto granular, correspondente a região granular que constituem a parede cística em desenvolvimento. Nota-se também uma matriz finamente granular, preenchendo todos os espaços entre os parasitos intracísticos, a matriz cística (Fig. 4.15A-C; 4.16A-D; 4.17A-C e D; 4.18A e C; 4.19A-A' e B e B'). Os vários parasitos no interior do cisto apresentam róptrias bastante eletrondensas (Fig. 4.15A-C; 4.16A-D; 4.17A-C; 4.18A; 4.19A e B e B'). As imagens dos parasitos em corte longitudinal mostram o núcleo posicionado na região posterior (Fig. 4.15A-B; 4.17A-C; 4.18A; 4.19B e B') e em alguns cortes, os grânulos de amilopectina foram revelados no citoplasma dos parasitos (Fig. 4.16A e D; 4.17C; 4.19A, A', B e B'). Este conjunto de características morfológicas são compatíveis com as formas bradizoítas cujo nicho de predileção são os cistos, reforçando a ideia do estabelecimento da cistogênese em enterócitos. Durante todas as etapas do processo se mantém a conexão de organelas com a MVP (Fig. 4.15A-C; 4.16A-D; 4.17A e B; 4.18A-C; 4.19B'). Detalhes desta associação podem ser bem visualizados nas Figuras 4.17A e B; 4.18C; 4.19A'). Culturas infectadas por 96 h até 6 dias mostraram cistos típicos, demonstrando que o

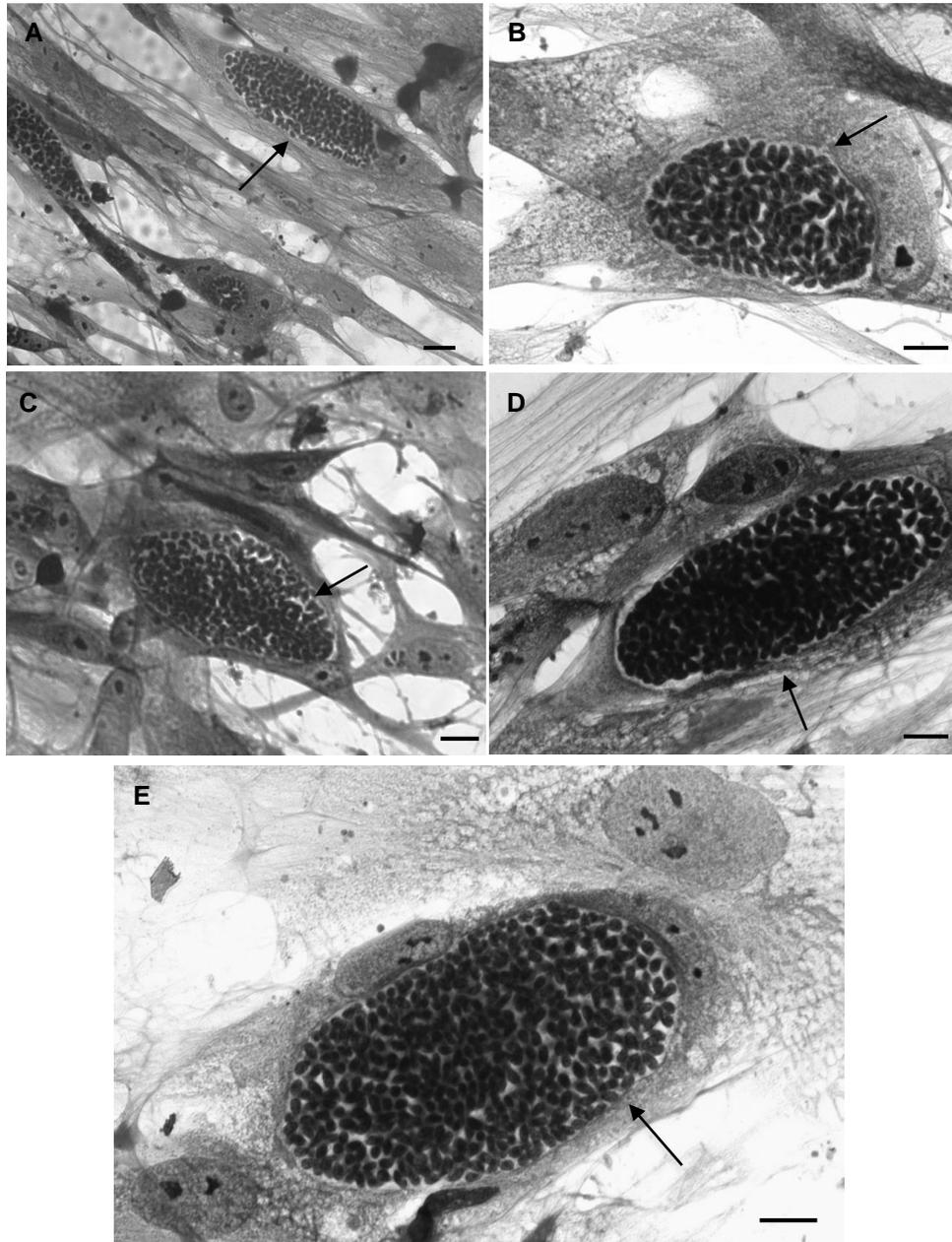


Figura 4.14. Cultura de enterócitos de felinos (CEIF) infectadas por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. Relação parasito-célula: 1:10 com 72-96 horas de interação. Coloração pelo Giemsa. Observam-se células de grande volume, em confluência, infectadas ou não infectadas. (A-E) Presença de estruturas cisto-símile (setas), com grande número de parasitos em seu interior e a espessura do envoltório membranar circundando estas estruturas sugere se tratar da parede cística. Barras: 10 µm

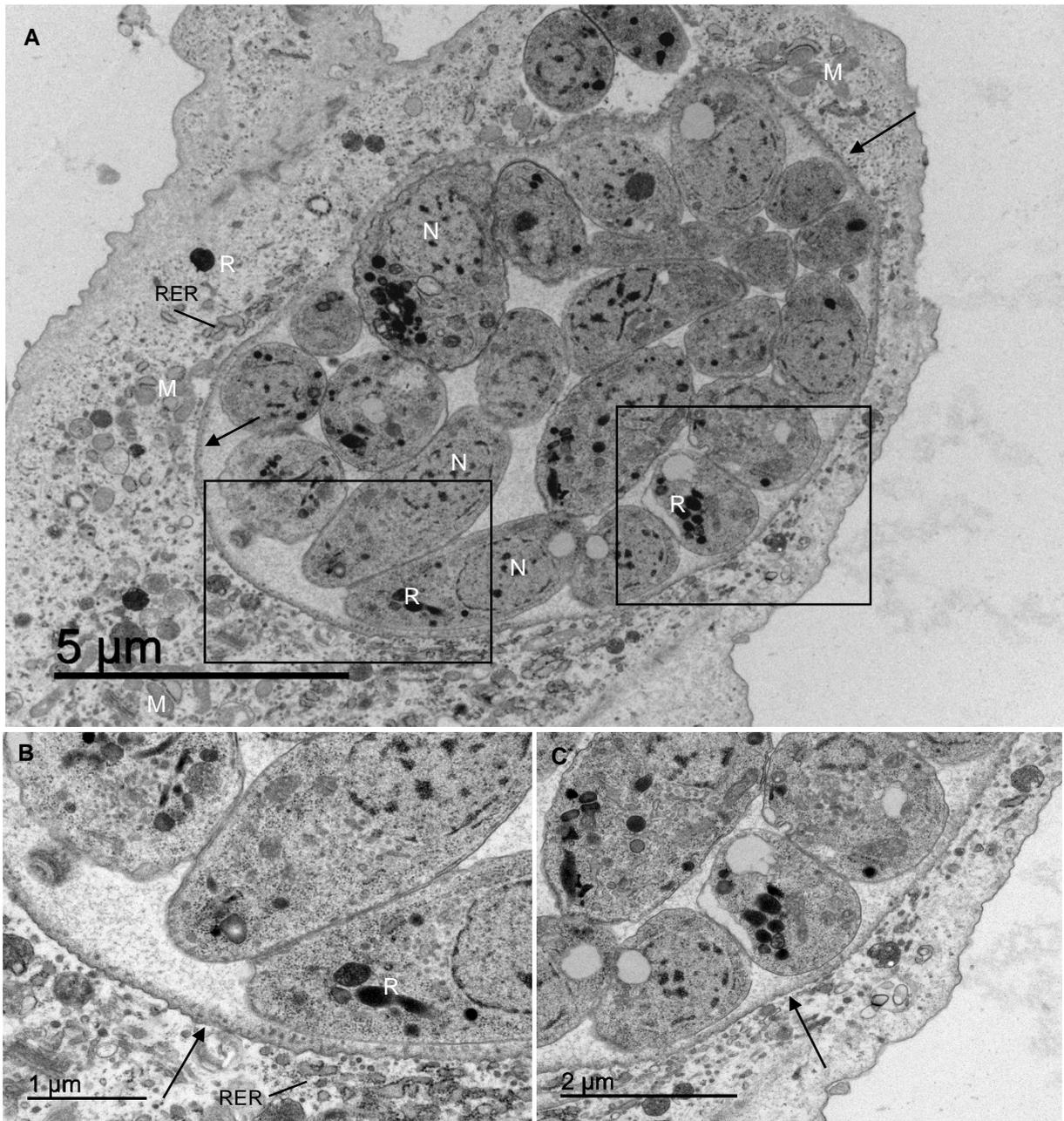


Figura 4.15. Caracterização morfológica ultraestrutural de cultura de enterócitos de felinos infectada por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49, por períodos de 96 h interação. (A) Observa-se estrutura cística (seta) com grande número de parasitos em seu interior com características comuns aos bradizoítos (róptrias eletrondensas - R) e núcleo na região posterior (N). Grande número de organelas como mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático (RER) são vistos associadas à parede cística. (B-C) Detalhe da parede cística (setas) visualizando-se a membrana e a região granular, com aspecto mais eletrondenso, logo abaixo da membrana.

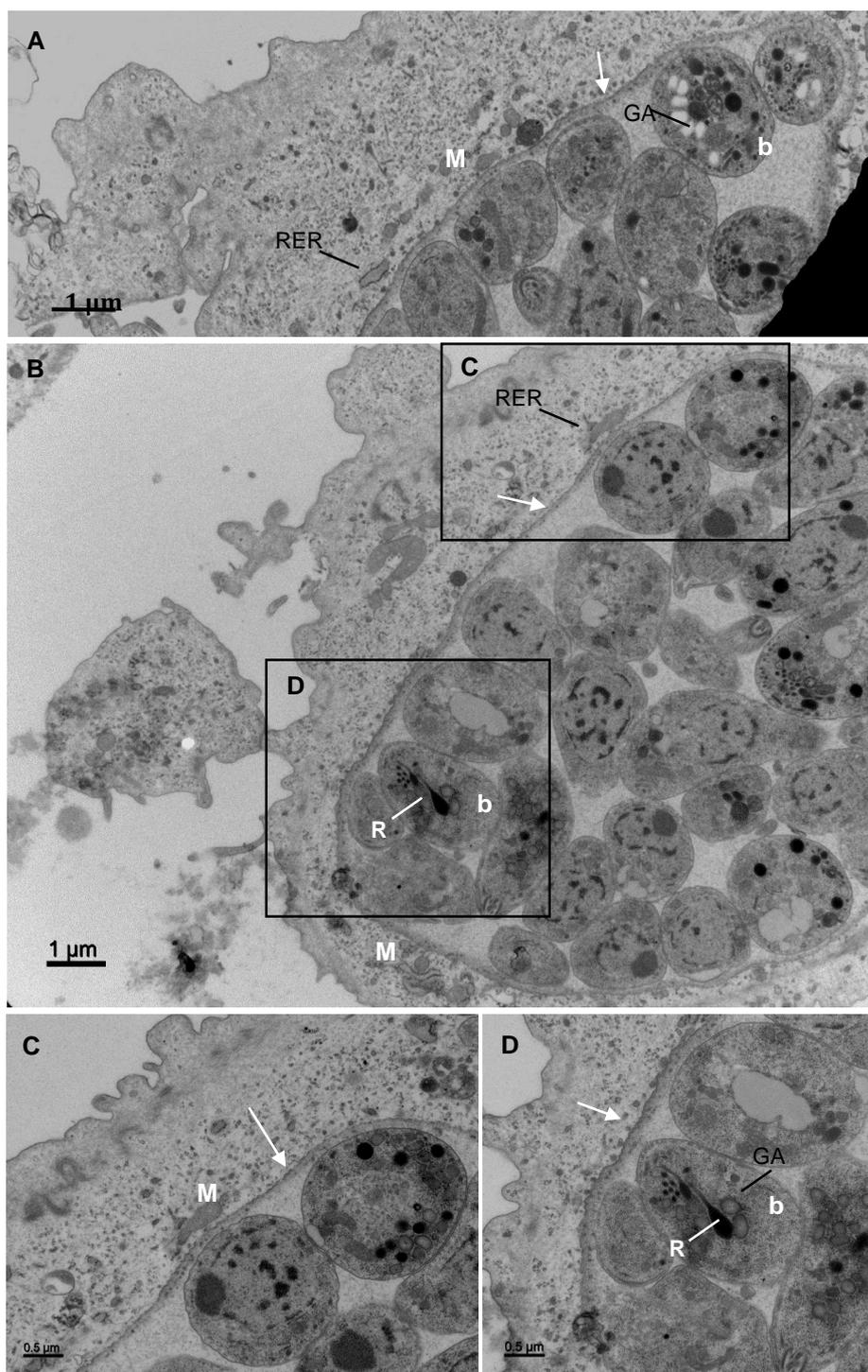


Figura 4.16. Ultraestrutura de enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A-D) com 96 h de interação. É possível observar cistos no interior das células, com parede cística bem desenvolvida (setas). Há grande número de organelas associadas aos cistos, incluindo retículo endoplasmático (RER) e mitocôndrias (M). (A, B e D). Observam-se parasitos contendo grânulos de amilopectina (GA) em seu interior e róptrias eletrondensas (R), característica de bradizoítos (b).

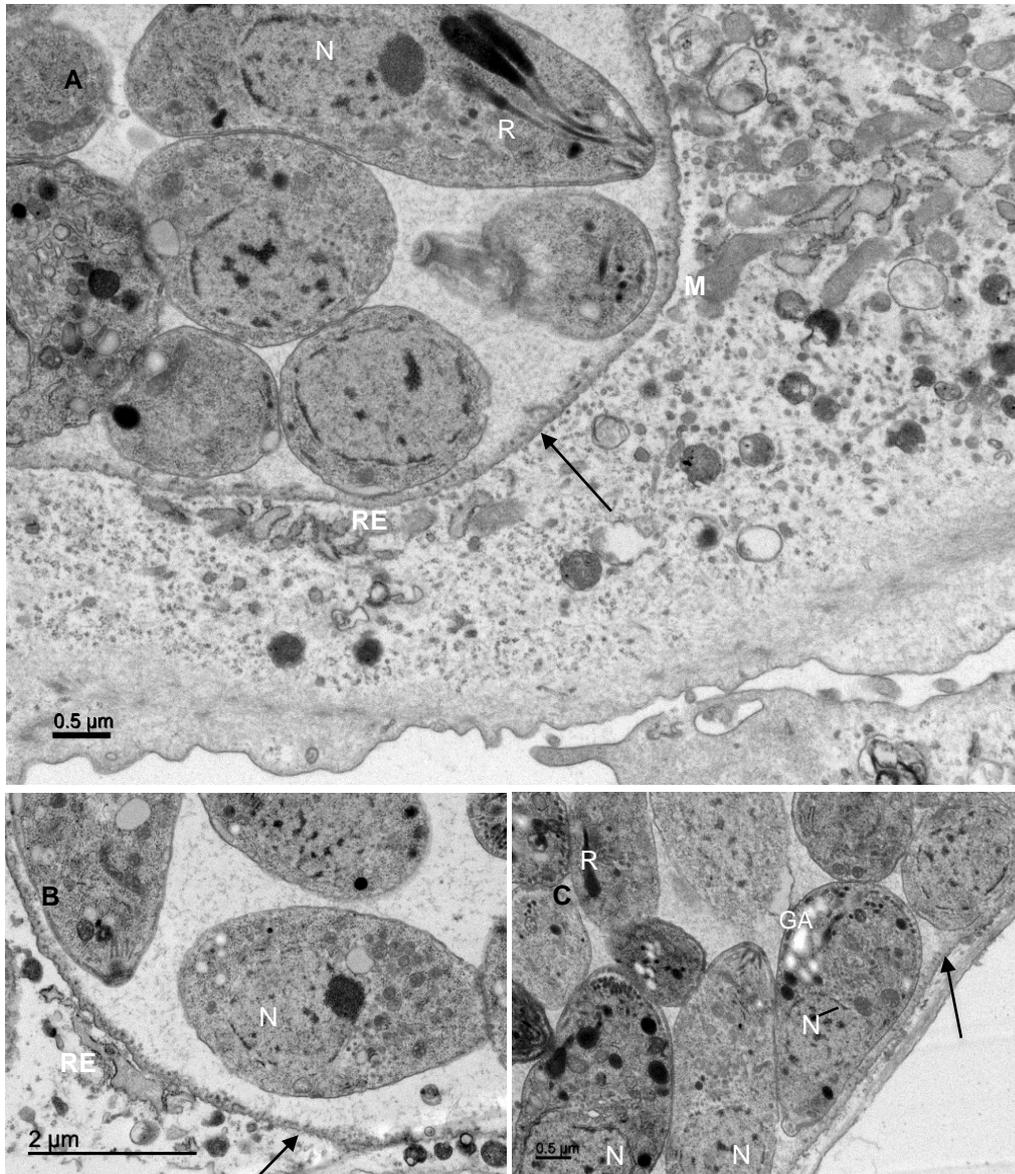


Figura 4.17. Ultraestrutura de enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 na proporção 1:10 parasito-célula, 96 horas de infecção. (A-C) Observam-se estruturas císticas no interior das células, com parede cística bem desenvolvida (setas) e grande número de organelas associadas, incluindo retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (M). (A) Presença de parasito com róptrias (R) bem eletrondensas e núcleo (N) posterior, características de bradizoítos. (C) Presença de bradizoíto contendo grânulos de amilopectina (GA) em seu interior.

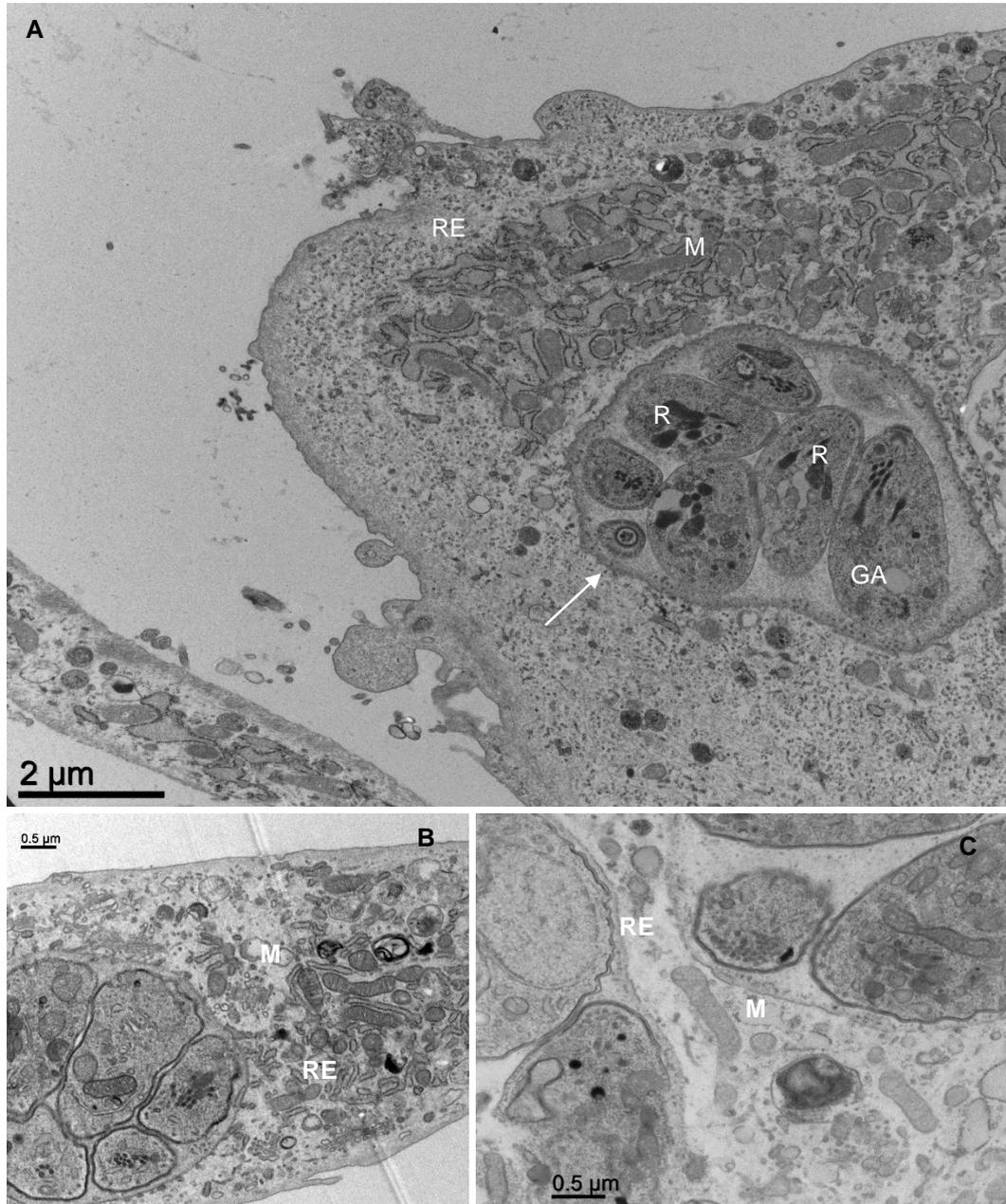


Figura 4.18. Ultraestrutura de enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 na proporção 1:10 parasito-célula, 6 dias de infecção. (A) Presença de cisto no interior da célula infectada, com parede cística bem desenvolvida (seta) e organelas associadas, incluindo retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (M). Presença de parasitos contendo róptrias bem eletrondensas (R) e grânulos de amilopectina (GA) em seu interior, característicos de bradizoítos. (B-C) Presença de organelas associadas aos cistos, como retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (M).

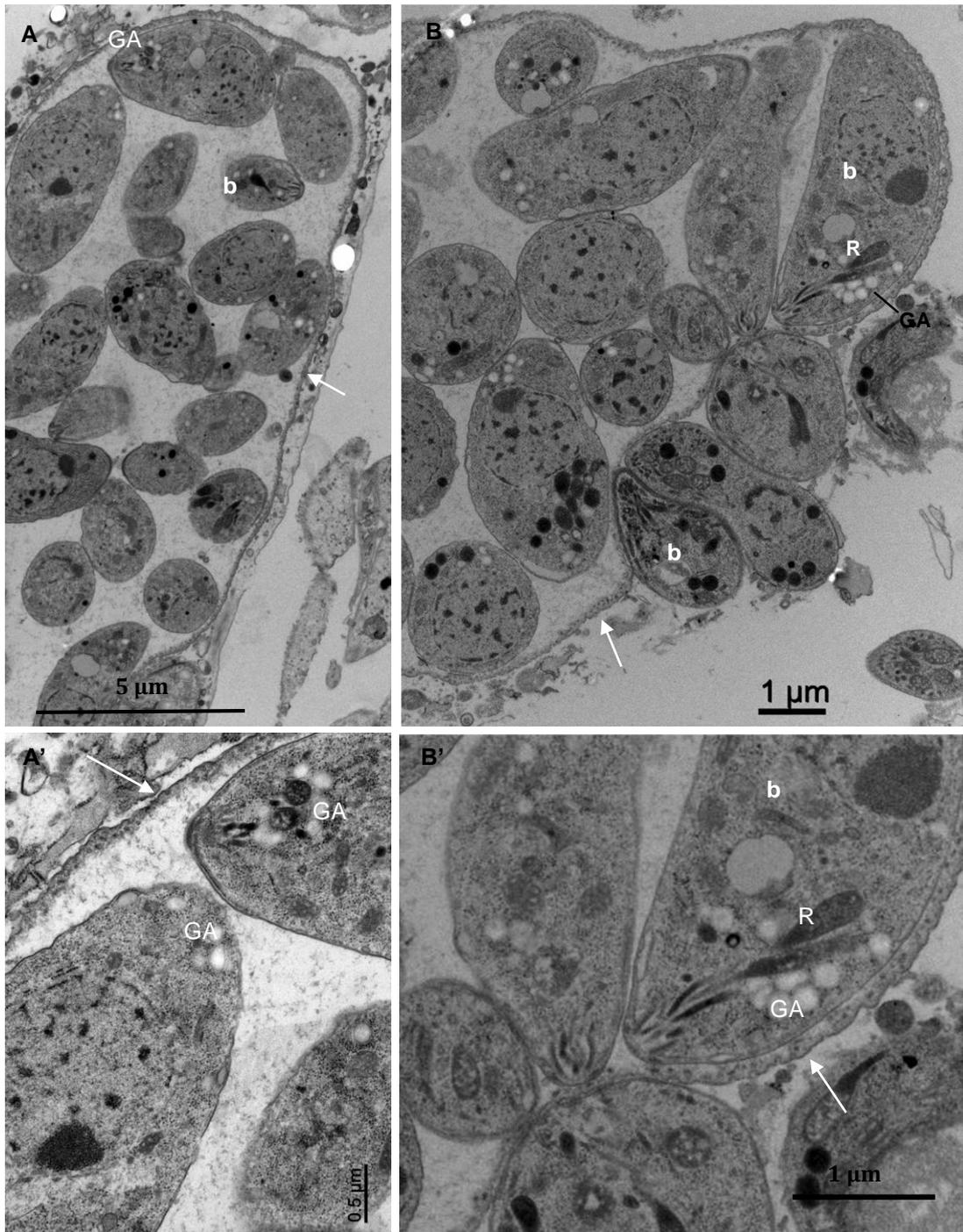


Figura 4.19. Ultraestrutura de enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49, proporção de 1:10 parasito-célula, 6 dias de infecção. (A e A'; B e B') Célula infectada com presença de cisto em seu interior. Observam-se parasitos com grânulos de amilopectina (GA) e róptrias eletrondensas (R) características de bradizoítos (b) e parede cística bem desenvolvida (seta).

desenvolvimento da cistogênese *in vitro* foi independente de manobras experimentais em enterócitos infectados com bradizoítos de *T. gondii*.

4.2.2.3 CICLO ENTEROEPITELIAL

A análise de culturas de enterócitos infectadas com bradizoítos, na relação 1:20, a partir de 48 h até 96 h de interação, coradas pelo Giemsa, permitiu a observação de estruturas organizadas no interior de grandes vacúolos contendo massas multinucleadas (Fig. 4.20A-C; 4.21). Estas estruturas têm uma grande variabilidade de formato e tamanho se assemelhando muito às encontradas *in vivo* no intestino de felinos (Fig. 4.20A-C; 4.21). Foi comum observar mais de uma destas massas multinucleadas numa mesma célula (Fig. 4.20B; 4.21). Ainda, há a ocorrência de vacúolos com massas multinucleadas ao lado de vacúolos contendo parasitos em processo clássico de endodiogenia, com formação de rosetas (Fig. 4.20C; 4.21) e em duplas (Fig. 4.21), em uma única célula. Estas massas multinucleadas são caracterizadas como esquizontes do tipo C, em um processo de divisão nuclear múltipla, com migração dos núcleos para a periferia, como pode ser melhor observado nas Figuras 4.20A e B e 4.21. Este processo de esquizogonia dá origem aos merozoítos que se inicia logo imediatamente abaixo da membrana do esquizonte como num “brotamento” e que será apresentado nas análises ultraestruturais. Com o avanço da esquizogonia, os merozoítos adquirirão um arranjo com distribuição periférica (Fig. 4.22A-F) com a presença (Fig. 4.22C-D e F) ou não de corpo residual (Fig. 4.22A e B). Observa-se numa mesma célula a ocorrência de vias diferentes de destino intracelular do parasito: ciclo lítico com formação de rosetas (Fig. 4.22A, C e F), cistogênese (Fig. 4.22E) e esquizogonia com esquizontes do tipo C (Fig. 4.22A-F).

Num estágio mais avançado da esquizogonia pode-se observar merozoítos já individualizados com núcleo volumoso (Fig. 4.23A e B), que os caracterizam como esquizontes do tipo C, como preconiza a descrição de Speer & Dubey (2005).

Um outro tipo de esquizonte detectado em enterócitos *in vitro*, de acordo com a descrição de modelos *in vivo*, foi um grupo de 3 parasitos com ou sem corpo residual (Fig. 4.24A e B; D e E), identificado como tipo D, em VP isolados no citoplasma de células onde vários estágios do desenvolvimento intracelular de *T. gondii* eram observados (Fig. 4.24A e B). Esquizonte do tipo E é sugerido na Figura 4.24D, com base em sua descrição no sistema *in vivo*.

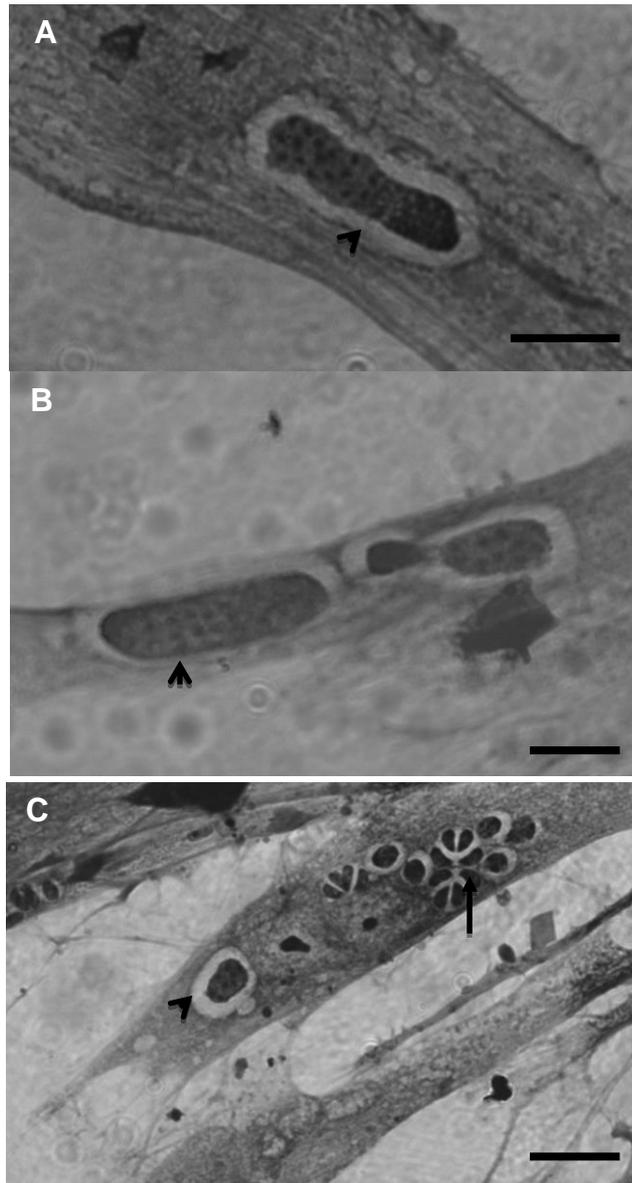


Figura 4.20. Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 48 h. (A-C). Massas multinucleadas (cabeça de seta) de formatos e tamanho variados são vistas em vacúolos grandes que correspondem aos esquizontes do tipo C. (B) Na mesma célula ocorre o ciclo lítico com formação de rosetas (seta). Barras: 10 μ m

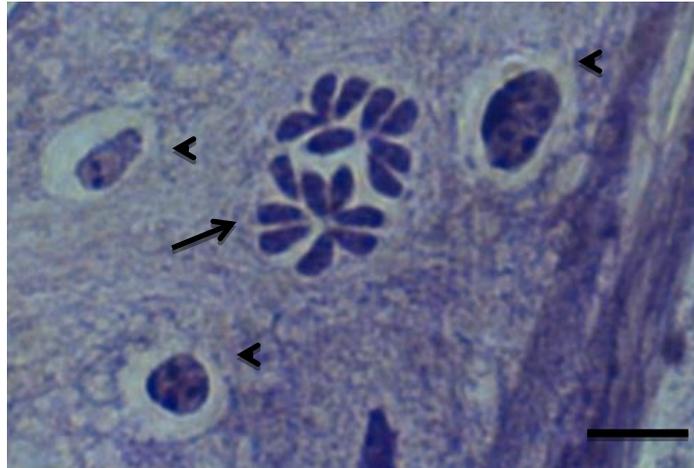


Figura 4.21. Enterócito infectado por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 48 h. É possível observar três massas multinucleadas de formatos e tamanhos variados em vacúolos grandes que correspondem aos esquizontes do tipo C (cabeça de seta). Na mesma célula ocorrendo simultaneamente ciclo lítico com formação de rosetas. Barra: 10 μ m

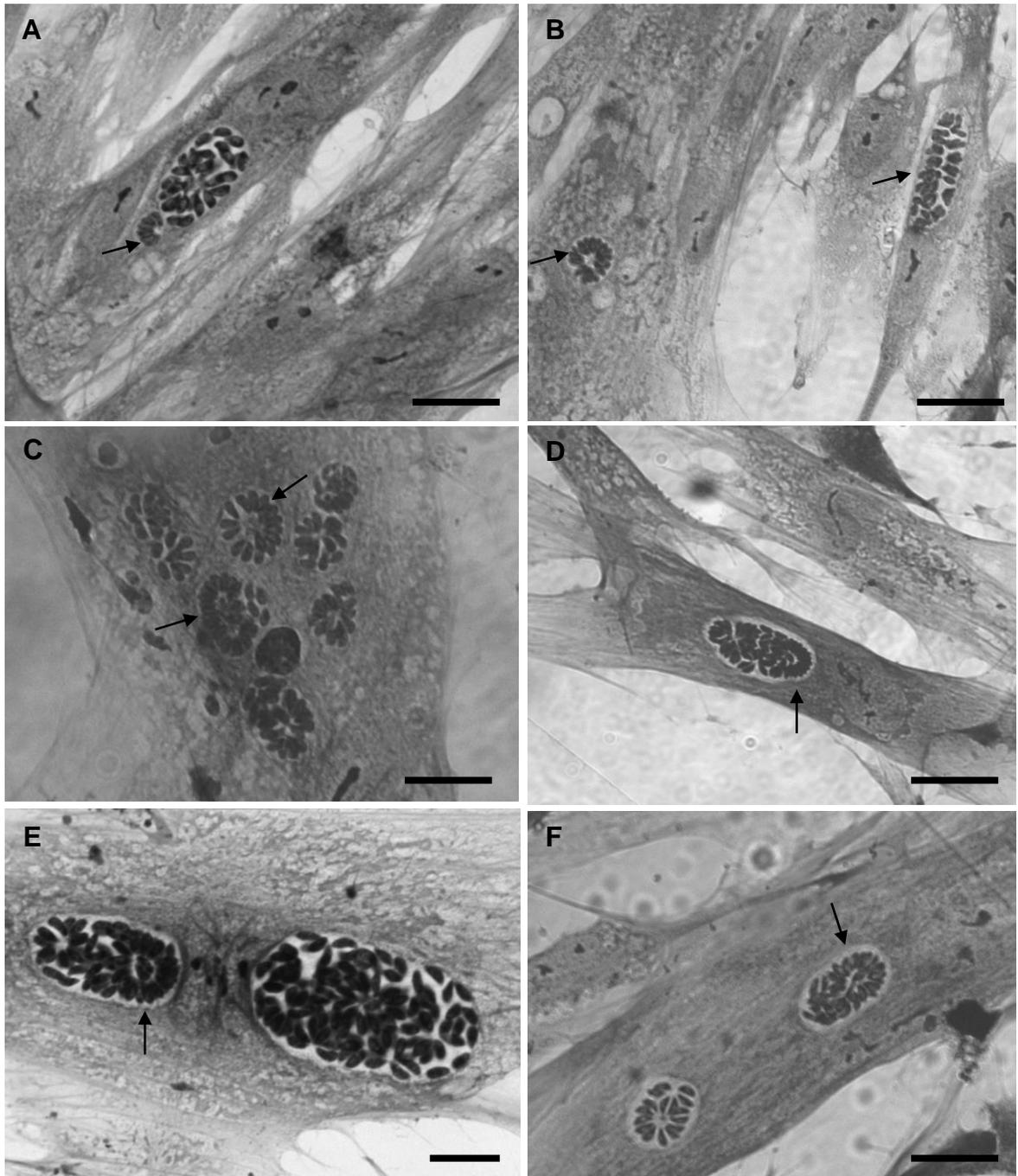


Figura 22. Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 72 h (A-F). Vários vacúolos contendo parasitos em processo de divisão celular por endopoligonia ou esquizogonia etapa em que os parasitos se encontram organizados periféricamente, os esquizontes do tipo C. (A, C e F) Paralelamente ocorriam outros processos de divisão celular, como ciclo lítico com formação de rosetas ou como em (E) cistogênese. Barras: 10 μ m

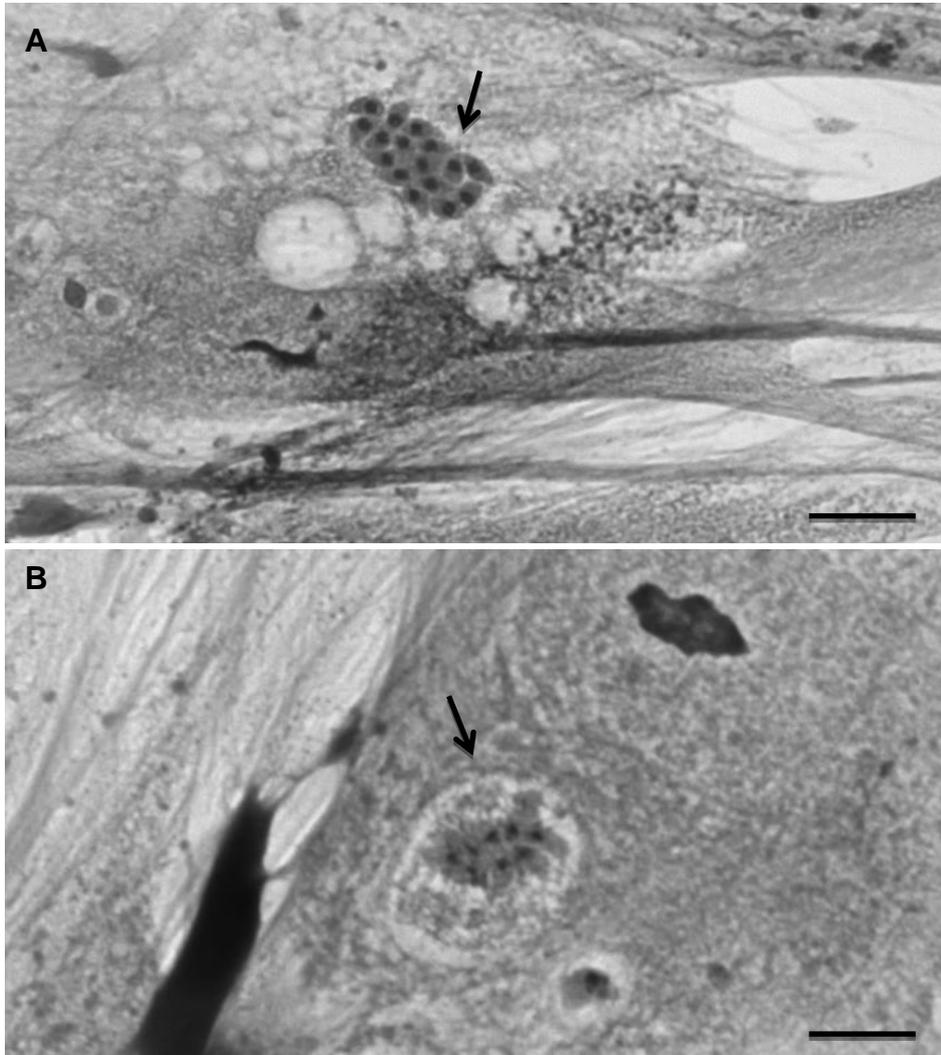


Figura 4.23. Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 por 72 h. (A e B) Pode-se observar parasitos em estágio mais avançado da esquizogonia ou endopoligenia apresentando merozoítos individualizados e com núcleo volumoso (setas). Barras: 10 μ m

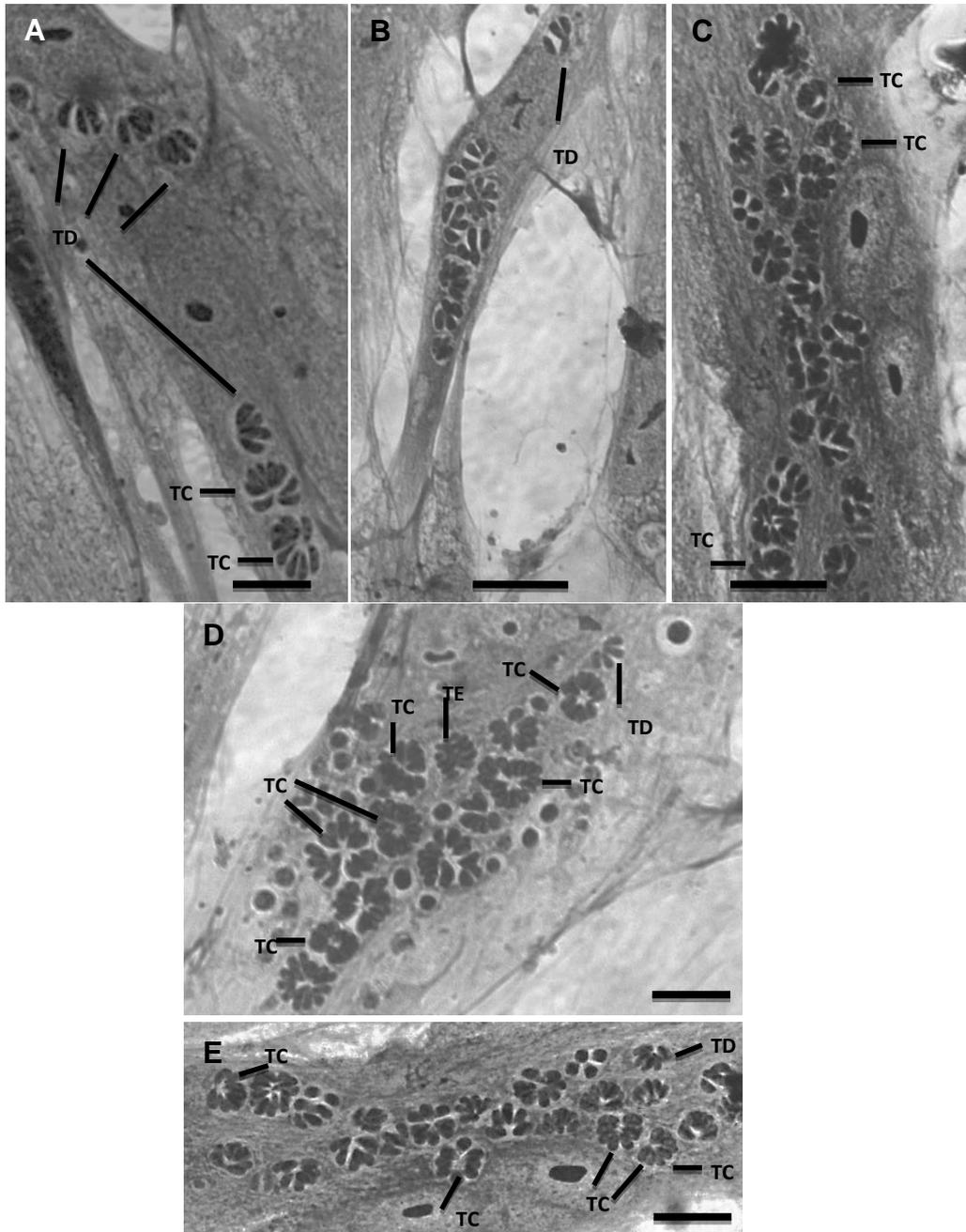


Figura 4.24. Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 após 96 h de interação. (A, B e E) Imagens sugestivas de esquizontes do tipo D em grupos de 3 parasitos com ou sem corpo residual (TD). (A, C-E) Esquizontes do tipo C (TC). (D) Esquizonte do tipo E (TE). Barras: 10 μ m

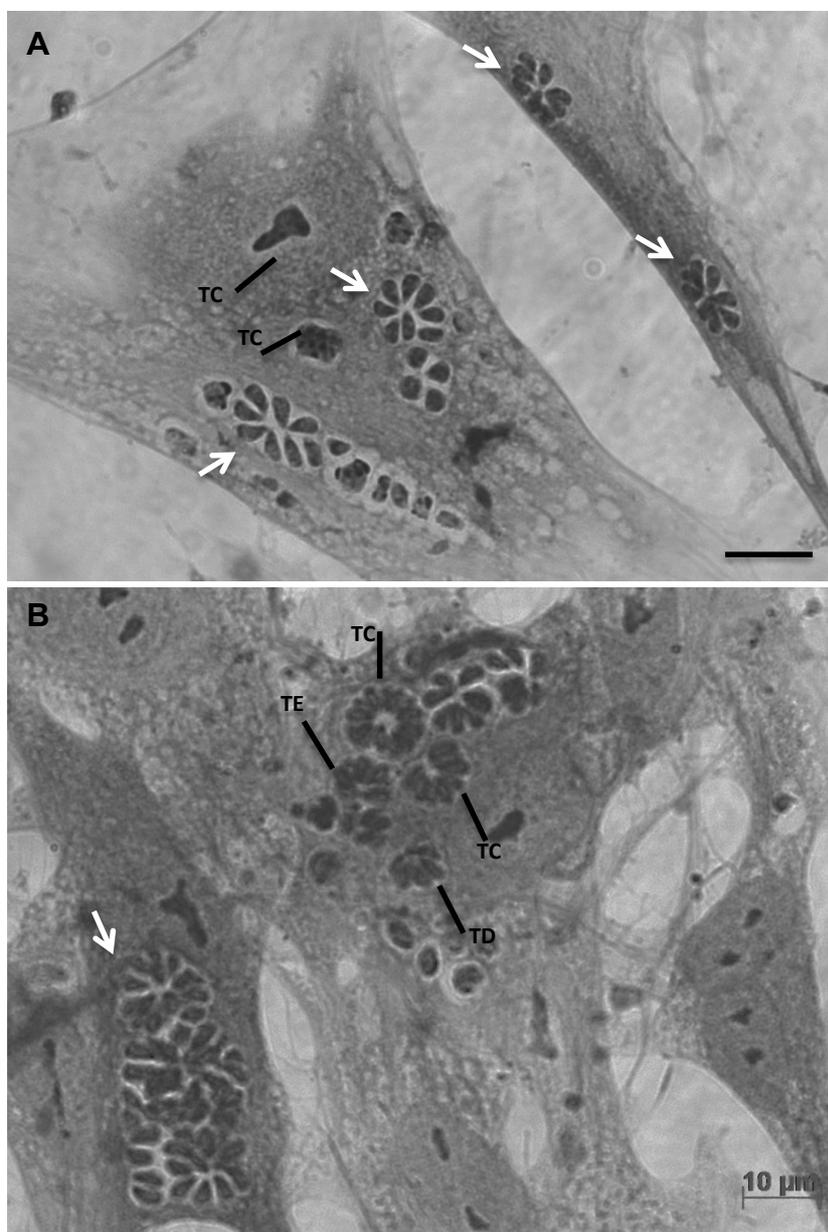


Figura 4.25. Enterócitos infectados por bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 após 96 h de interação. (A e B) Células multiinfectadas com diferentes estágios de desenvolvimento intracelular. (A) Parasitos em roseta (seta fina) e massas multinucleadas, esquizonte do tipo C (TC). (B) Imagens sugestivas de esquizontes do tipo D (TD) em grupos de 3 parasitos com corpo residual, esquizontes do tipo C (TC) e do tipo E (TE). Rosetas (seta branca fina). Barras: 10 μm

Imagens de células altamente infectadas apresentando diferentes estágios de desenvolvimento de esquizontes podem ser identificados: esquizontes do tipo C como massas multinucleadas (Fig. 4.25A) ou como parasitos organizados periféricamente (Fig. 4.24A, C-E; 4.25B), esquizontes do tipo D (Fig. 4.24A e B; 4.25B), esquizontes do tipo E (Fig. 4.24D; 4.25B) e rosetas (ciclo lítico) (Fig. 4.24B-D; 4.25A e B).

A análise ultraestrutural destas culturas infectadas por períodos que variaram de 48 h a 9 dias mostrou VP contendo parasitos com tipos morfológicos semelhantes aos estágios enteroepiteliais de *T. gondii*, observados por microscopia óptica corados pelo Giemsa e também pela histologia do intestino de felídeos descrito por outros autores, reforçando a sugestão de que a reprodução parcial do seu ciclo entérico foi desenvolvida *in vitro*, conforme detalhado a seguir.

As micrografias eletrônicas mostram enterócitos com estruturas multinucleadas que correspondem aos esquizontes do tipo C (Fig. 4.26A-D; 4.27A-D; 4.28A-E) à semelhança daquelas formas detectadas por microscopia óptica coradas pelo Giemsa (Fig. 4.20A-C; 4.21; 4.25A). As características morfológicas ultraestruturais destas massas multinucleadas mostram número variado de núcleos em cada uma destas estruturas que variam muito de tamanho e forma, maior incidência de formas arredondadas, presença de grânulos densos volumosos, corpúsculos lipídicos numerosos e de tamanho variado, grande quantidade de RER e numerosas mitocôndrias de diferentes tamanhos (Fig. 4.26A-D; 4.27A-D; 4.28 A-E). Estas formas também apresentam uma rede túbulo vesicular bem desenvolvida na matriz do vacúolo, melhor observada nas Figuras 4.26D, 4.27A-D; 4.28A-E. A partir destas massas multinucleadas num determinado estágio de desenvolvimento da endopoligenia ou esquizogonia, os merozoítos construídos dentro destas massas começam a migrar para a periferia, à semelhança de um “brotamento” na superfície destas estruturas, sendo facilmente reconhecidos pela presença do conóide emergindo e foram identificados como esquizontes do tipo C (Fig. 4.26C e D; 4.27D; 4.28A-E). A Figura 4.28A-E sugere que esquizontes do tipo D estejam se formando à semelhança do descrito por microscopia óptica coradas pelo Giemsa (Fig. 4.24A, B, D e E; 4.25B). Durante todo este processo, as organelas da célula hospedeira se associam a estes VP, como RER e mitocôndrias (Fig. 4.27B-D; 4.28B-E; 4.28A, B, E e F).

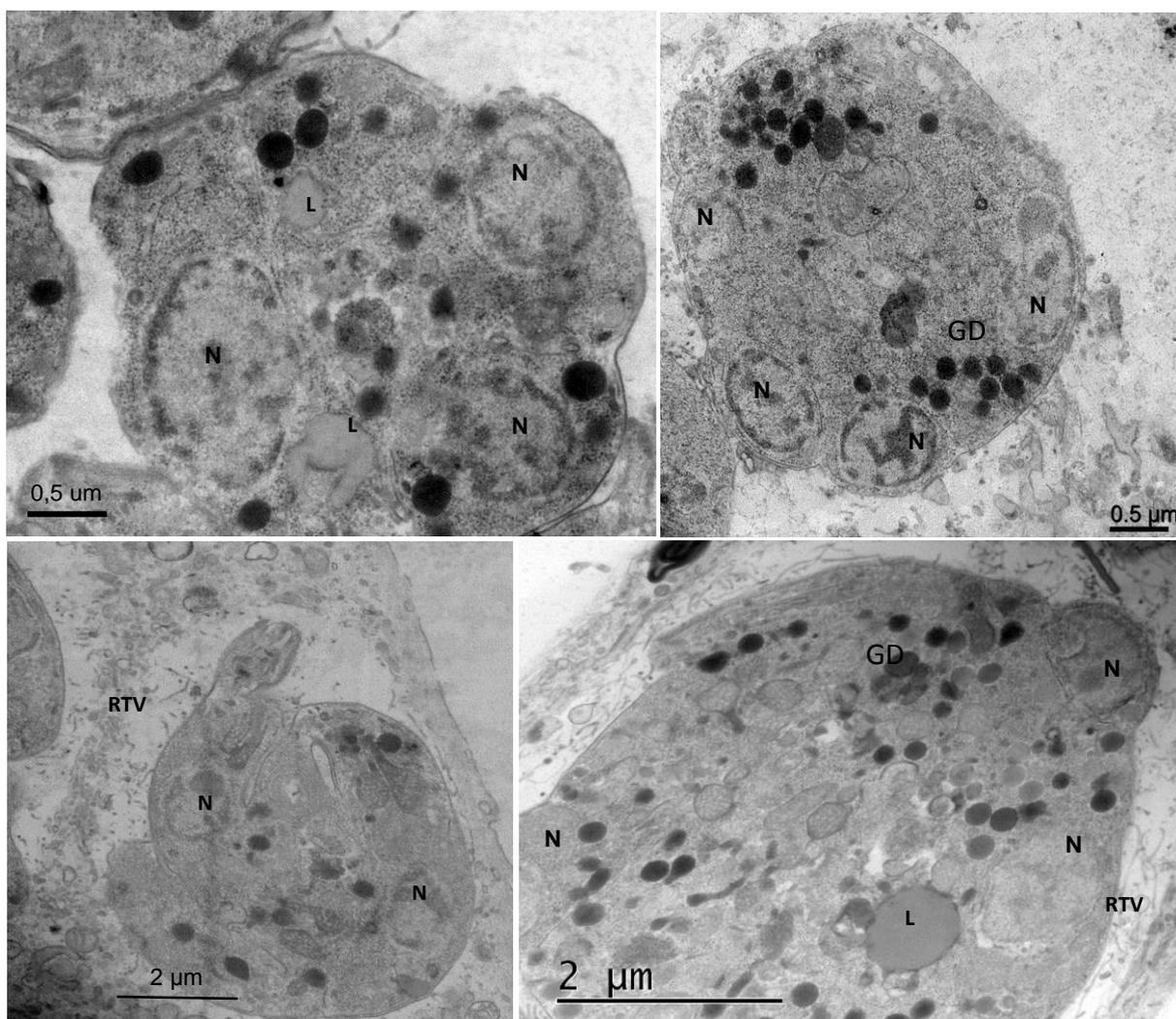


Figura 26. Ultraestrutura de enterócitos contendo esquizontes do tipo C. (A-D) Estruturas semelhantes a esquizontes do tipo C. Grandes vacúolos contendo uma massa multinucleada com a presença de mitocôndrias (M), grânulos densos (GD), retículo endoplasmático rugoso (RER) e lipídios (L). (C e D) Rede túbulo-vesicular (RTV) no espaço vacuolar.

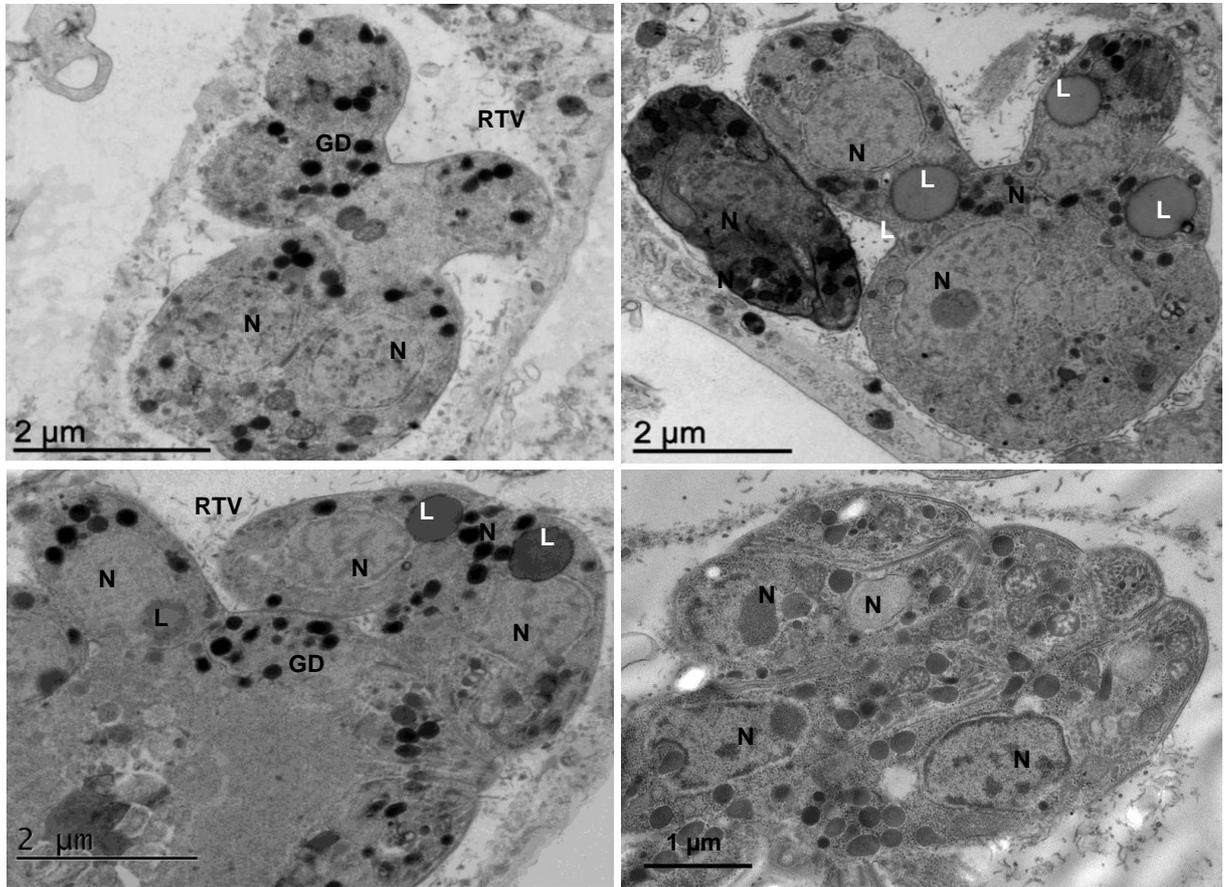


Figura 27. Ultraestrutura de enterócitos contendo esquizontes do tipo C. (A-D) Estruturas semelhantes a esquizontes do tipo C. Grandes vacúolos contendo uma massa multinucleada com a presença de grânulos densos (GD) e lipídios (L). Rede túbulovesicular (RTV) no espaço vacuolar. (A-C; E) Merozoítos emergindo da massa multinucleada (setas).

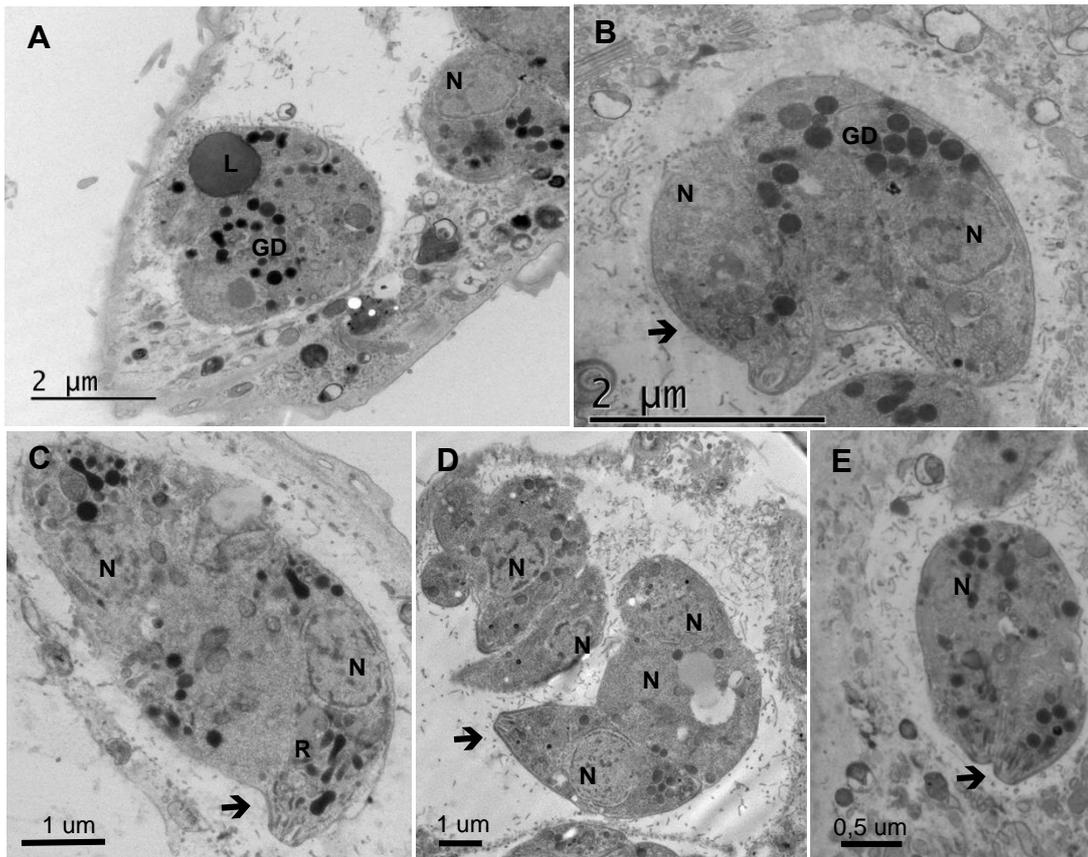


Figura 28. Ultraestrutura de enterócitos contendo esquizontes do tipo D. (A-E) Estruturas semelhantes a esquizontes do tipo D. Vacúolos contendo estruturas com 3-4 merozoítos emergindo dessas estruturas (setas). Presença de muitos grânulos densos (GD), róptrias eletrondesas (R) e lípidios (L). (A-E) Rede túbulo-vesicular no espaço vacuolar.

5. DISCUSSÃO

A distribuição universal da toxoplasmose e o importante papel que os felinos exercem na transmissão de *Toxoplasma gondii* estimulam o entendimento em detalhes do seu ciclo enteroepitelial, visando a compreensão de aspectos biológicos e moleculares que permitam intervir na disseminação do parasito e conseqüentemente, na dispersão desta zoonose. Neste contexto, o presente estudo empregou culturas primárias de células epiteliais intestinais de felino (CEIF) como modelo celular para explorar a sua interação com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49.

A eleição deste tipo celular se justificou pela necessidade de se avaliar os diferentes estágios de desenvolvimento da infecção por *T. gondii* em felinos, considerando-se que: (I) o ciclo sexuado do parasito ocorre exclusivamente no epitélio intestinal de felinos (revisto em Ferguson, 2009); (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 (Dubey, 1998).

A caracterização morfológica do ciclo enteroepitelial de *T. gondii* no hospedeiro definitivo está limitada a poucos estudos realizados com modelos *in vivo* (Frenkel e cols. 1970; Dubey e Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009), dificultando o acompanhamento cinético da evolução da infecção. Os eventos temporais estabelecidos durante este ciclo *in vivo* ficam sujeitos a análises subjetivas, visto que estudos histológicos do intestino não permitem monitorar a seqüência real da diferenciação dos estágios infectivos do parasito. Por outro lado, a prática da eutanásia de gatos para estudos científicos é restrita (Ferguson, 2009), o que corrobora a necessidade de se introduzir modelos de investigação alternativos para explorar o ciclo enteroepitelial de *T. gondii*. Desta forma, nosso grupo introduziu a cultura primária de enterócitos de felinos visando reproduzir este ciclo *in vitro* (Moura e cols., 2009; De Munoz, 2015).

Várias tentativas de cultivar células epiteliais intestinais, de animais adultos, ou de se estabelecer linhagens celulares derivadas de enterócitos normais, não foram muito bem sucedidas (Mehran e cols., 1997). Este desafio foi plenamente alcançado neste estudo com o estabelecimento de culturas primárias de CEIF, oriundas de fetos de felinos, cultivadas por até 15 dias apresentando boa viabilidade celular e mantendo suas

características morfológicas e capacidade proliferativa. Desta forma, o sucesso de isolar e manter a cultura primária de CEIF pelo nosso grupo, por longo tempo, abriu novas perspectivas para estudos com enteropatógenos *in vitro* (Moura e cols., 2009; De Muno, 2015). O cultivo de CEIF nestes estudos dependeu de alguns fatores: primeiro, uso de tecido intestinal felino fetal, essencial para gerar células epiteliais proliferativas em cultura (Siddiqui & Chopra, 1984; Quaroni & Beaulieu 1997); segundo, a digestão do epitélio intestinal, empregando dissociação não enzimática, permitiu obter células viáveis e a partir de pequenos fragmentos formar explantes capazes de contribuir com fatores essenciais para o crescimento e viabilidade da CEIF e, terceiro, a atividade sinérgica de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (Sanderson e cols., 1996; Aldhous e cols., 2001) e, como sugerido por Desmarests e cols. (2013), a introdução de insulina humana, hidrocortisona, aminoácidos não essenciais e T3 também contribuíram muito para o estabelecimento de um microambiente favorável ao crescimento sustentável de CEIF e permitiram estender o período de interação *T. gondii*-enterócitos por até 9 dias com boa preservação das células.

É bem conhecida a suscetibilidade de células epiteliais intestinais durante a dissociação do tecido, comparando-se com outros tipos de células epiteliais, constituindo-se assim como um dos fatores limitantes para obtenção de células isoladas. Objetivando minorar esse efeito negativo, nossa estratégia foi empregar dois métodos simultaneamente: dissociação mecânica e não-enzimática como preconizado por Whitehead e cols. (1987), Follmann e cols. (2000) e Aldhous e cols. (2001). Esta metodologia, empregando fragmentos intestinais de fetos de felinos, se mostrou eficiente, rápida e com bom rendimento de viabilidade, como indicado pela análise de citometria de fluxo previamente padronizado por Moura e cols. (2009). Diferindo, portanto, dos métodos enzimáticos com colagenase, tripsina e/ou EDTA testados por outros autores (Evans e cols., 1994; Potten e cols., 1994; Potten e Grant, 1998), os quais aplicados em nosso modelo acarretou baixo rendimento e reduzida viabilidade celular. Nossos resultados ratificam as conclusões do grupo de Mac Donal (Mac Donal e cols., 2009) de que com o método quelante se obtém mais populações com fenótipo mais próximo do tecido. Durante o isolamento de células do epitélio intestinal, a interrupção dos contatos das células epiteliais normais com a matriz extracelular desencadeia fenômenos de morte celular programada, chamados

coletivamente como anoikis, que ocorre em células dependentes de ancoragem quando se desprendem da matriz extracelular. As células-tronco intestinais são altamente sensíveis ao anoikis (Frisch e Francis, 1994; Strutter e cols., 1996; Potten e cols., 1997; revisto em Kaeffer, 2002). Além disso, outros fatores influenciam no crescimento bem-sucedido da cultura primária: (i) o alto risco de contaminação dessas culturas (minimizado no nosso caso, pelo emprego de fetos); (ii) a vida curta de enterócitos *in vivo* em virtude do alto grau de diferenciação dessas células; e, (iii) o grande dinamismo do tecido *in vivo*, pois que essas células são renovadas a cada 4 a 5 dias.

Há de se considerar que na vilosidade intestinal há enterócitos em diferentes estágios de diferenciação, sendo os da base do vilo, os menos diferenciados e os do ápice, os mais diferenciados, com ganho de função absorptiva e perda da atividade mitótica (Chougule e cols., 2012). Daí, quanto menos avançado for o estágio de desenvolvimento do feto, maior a chance de se recolher as células da base e ter uma alta atividade mitótica que possibilite maior eficiência na manutenção destas células *in vitro*. Nas nossas condições, as células isoladas ou a partir de pequenos fragmentos de tecido fetal proliferaram em diferentes superfícies (plástico ou vidro) formando monocamadas confluentes. Hahn e cols. (1987) compararam a sobrevivência de enterócitos em cultura primária em superfície com fibronectina e superfície revestida em biomatriz com colágenos e demonstraram que as culturas em biomatriz sobreviveram até 4 dias ou mais, enquanto as culturas em fibronectina somente até 48 h. A sobrevivência das células epiteliais intestinais depende não somente do contato célula-célula, mas também de substrato. Deste modo, isto pode justificar o melhor resultado que obtivemos das culturas em superfícies revestidas com colágeno 0,01%, corroborando os resultados de Evans e cols. (1994) com enterócitos de ratos. Sob essas condições, culturas de enterócitos de felinos, apresentaram organização e características epiteliais, tais como, alinhamento e grande volume celular por períodos de mais de 9 dias, com reduzida ocorrência de morte celular. Como previamente descrito por Whitehead e cols. (1987), estas células foram capazes de aderir e proliferar até formar monocamadas confluentes, como as obtidas no presente estudo.

Alguns pontos deverão ser discutidos em relação à maturidade e às características morfológicas de enterócitos em cultura. Quanto a polarização das células epiteliais, por exemplo, é sabido ser dependente de condições específicas,

como a formação de estruturas de contato celular e interações com o substrato celular, envolvendo nutrientes essenciais, fatores de crescimento e moléculas de matriz extracelular (Sanderson e cols., 1996; revisado em Simon-Assmann e cols., 2007). A modificação do meio de cultura com moléculas específicas da matriz, embora não tenha potencializado a polarização, induziu outras características intestinais epiteliais, como microvilosidades. Estes eventos têm sido associados ao cultivo de enterócitos por longo período de tempo, formando uma monocamada colunar polarizada de enterócitos de aparência madura com a presença de interdigitações, microvilosidades e complexos juncionais mais evidente entre 20 e 30 dias de cultivo (Levy & Bendayan, 2000; Oriolo e cols., 2007). Embora a formação de junções tenha sido pouco frequente em nosso modelo, a microscopia eletrônica de varredura revelou que culturas mantidas por até 9 dias apresentavam numerosos filopódios e interdigitações que estabeleciam contato com outras células, confirmando a descrição de Steimer e cols. (2006). Adicionalmente, as culturas epiteliais intestinais aqui analisadas mostraram uma população homogênea de células epiteliais com grande expansão citoplasmática, núcleos centrais e crescimento das monocamadas na forma de colônias compactas poligonais, como descrito em outros sistemas por Quaroni (1985) e Baten e cols. (1992).

Previamente, Moura (2008) caracterizou a morfofisiologia das culturas de CEIF revelando, com a metodologia de isolamento e cultivo empregada (ligeiramente modificada no presente estudo), que mais de 95% das células intestinais em cultura expressavam citoqueratina como indicativo da sua natureza epitelial, conforme descrito por Macartney e cols. (2000). Ainda, como proposto por Sanderson e cols. (1996), Follmann e cols. (2000) e Quinlan e cols. (2006), a detecção de um outro marcador de enterócitos, a fosfatase alcalina, persistiu no nosso modelo de cultura primária de enterócitos de felinos por até 9 dias (Moura, 2008).

Tem sido apontado que a expressão dos marcadores de diferenciação típicos dos enterócitos muda com o número crescente de passagens (Artursson e cols. 2001). Além disso, parâmetros como resistência elétrica transepitelial e taxa de proliferação aumentam com o número de passagens (Briske Andersson e cols., 1997). Nós temos acumulado experiência desde a introdução deste modelo celular no laboratório de que células mantidas até 15 dias são viáveis para subcultivo até 5-6 passagens, sem perda das características epiteliais. Sob as nossas condições

experimentais, após esse período de cultivo e número elevado de repiques, a maioria das células começa a demonstrar sinais de senescência com achatamento, vacuolização e morte celular.

A cultura primária do intestino epitelial felino, obtida a partir do intestino delgado fetal, mantém suas características fisiológicas e funcionais *in vitro*. As limitações deste tipo celular se concentram principalmente no fato de que culturas primárias de enterócitos são capazes de reter funções específicas por um período limitado, mas tais modelos, são mais propensos a refletir a situação *in vivo* do que as linhagens celulares (Simon-Assmann e cols., 2007). Estas dificuldades se refletem no progresso lento de desenvolvimento de técnicas reprodutíveis para o epitélio intestinal. Em 2013, Desmarests e colaboradores apresentaram alternativas usando enzimas para dissociação do tecido intestinal de felinos, além da adição de mais hormônios, como introduzido no presente estudo, porém nossas tentativas em reproduzir suas culturas com dissociação enzimática, falharam. O sistema de cultura de CEIF empregado neste estudo foi inicialmente estabelecido como modelo para estudos do epitélio intestinal (Moura, 2008), uma vez que linhagens celulares, que são frequentemente utilizadas para experiências *in vitro*, perdem várias funções específicas de órgãos, devido ao seu estado avançado de diferenciação.

Em conclusão, as células epiteliais intestinais felinas podem se diferenciar em enterócitos funcionais e serem aplicadas como modelo para o estudo de um grande painel de eventos biológicos celulares, de interações célula-enteropatógenos, bem como, contribuir para novas aplicações terapêuticas, como rastreamento de fármacos. Nosso interesse é aplicar cultura primária de epitélio intestinal felino para estudo do ciclo entérico de *T. gondii in vitro*, tendo em vista que não há linhagens comercialmente disponíveis, visando contribuir para o melhor entendimento deste processo único que ocorre no seu hospedeiro definitivo, os felinos.

O emprego de CEIF como modelo para o estudo da interação *T. gondii*-célula hospedeira permitiu monitorar a infecção e investigar novos aspectos desta interação. Previamente, Moura e cols. (2009) durante análises quantitativa e qualitativa mostrou que a relação parasita/célula hospedeira utilizada durante os ensaios de interação foi decisiva para o desenvolvimento de *T. gondii*, resultando em diferentes vias do destino intracelular do parasito: (i) ciclo lítico na carga parasitária de 1:5 (parasito/célula hospedeira) devido à diferenciação de bradizoíto em taquizoítos, culminando em sua

proliferação intensiva e lise de células hospedeiras; (ii) cistogênese, induzindo à formação de cistos na razão 1:10 (parasito/célula hospedeira) e, (iii) a geração de formas de esquizontes de *T. gondii in vitro* com a razão 1:20 (parasito/célula hospedeira). Frente a esses dados, nosso objetivo no presente estudo foi analisar ultraestruturalmente estes eventos intracelulares, tendo em vista o pioneirismo do nosso grupo, em introduzir enterócitos como modelo de estudo dos processos celulares que induzem o ciclo sexual de *T. gondii* em felinos.

Alguns aspectos metodológicos merecem especial atenção: o emprego de bradizoítos como fonte de infecção se justifica porque representa uma das rotas naturais de transmissão de *T. gondii* (através do consumo de carne crua por animais carnívoros ou humanos) e representa a principal rota de contaminação para felídeos, pois a transmissão do parasito é mais eficiente quando os gatos consomem cistos teciduais (Dubey, 2006). Ferguson (2004), por meio de diagramas esquemáticos, mostrou todas as possíveis rotas de desenvolvimento e conversão de estágios do parasito que poderiam ocorrer entre as várias formas de infecção durante o ciclo de vida de *T. gondii*. Chama a atenção de que o único estágio infeccioso capaz de converter diretamente em merozoíto foi o bradizoíto. Esses dados reforçam a escolha de bradizoítos como fonte de infecção no presente estudo, possibilitado a diferenciação bem sucedida de bradizoítos em merozoítos *in vitro*, como demonstrado aqui por microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Experiências *in vitro* mostraram que alguns parasitos se replicam rapidamente como taquizoítos para amplificar a infecção independente da fonte da forma infecciosa (taquizoítos, bradizoítas ou esporozoítos), como descrito por Dubey (1997). A conversão de bradizoítos em taquizoítos é um processo natural que ocorre a partir de 15 h em culturas de células sem a adição de substâncias imunomoduladoras (Gross e cols. 1996). Confirmou-se a ocorrência deste processo em CEIF infectado com bradizoítos da cepa ME49 na razão 1:5 (parasito/célula hospedeira) com maior incidência e também nas relações 1:10 e 1:20, porém nestas duas últimas relações a ocorrência foi bem menor, mas possibilitou analisar o destino intracelular de *T. gondii* nas 3 vias: ciclo lítico, cistogênese e esquizogonia nestas relações por períodos que variaram de 3-9 dias de interação.

A taxa de conversão e o estabelecimento da cistogênese *in vitro* têm sido relatados como dependentes de intervenções experimentais, como aumento de

temperatura ou alterações de pH, como proposto por Soête e cols. (1993, 1994) e Dziarszinski e cols. (2004). Acredita-se que a cistogênese seja um evento espontâneo dependente: (i) da cepa de *T. gondii*; (ii) do tipo celular onde o parasito se alberga. Por exemplo, cepas avirulentas (tipo II), como ME49, têm uma habilidade natural para formar cistos em células de mamíferos (McHugh e cols., 1993; Darde e cols., 1989; Lindsay e cols., 1991; Guimarães e cols., 2008, 2009; De Muno e cols., 2014). Nosso grupo tem aberto à discussão de que fatores celulares intrínsecos poderiam promover a diferenciação de estágio em *T. gondii* sem a necessidade de fatores de estresse extrínsecos. No entanto, esta questão não foi ainda totalmente esclarecida. Neste contexto, destaca-se que as células musculares esqueléticas estimulam a estágio-conversão dos parasitos e a formação dos cistos espontaneamente (revisto em Ferreira-da-Silva e cols., 2008; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a), inclusive nas infecções com cepas altamente virulentas do parasito, como a RH, cepa do tipo I (Ferreira-da-Silva e cols., 2009a). Um outro fator que tem sido apontado é a saída do ciclo celular que ocorre na diferenciação das células musculares e neuronais promovendo essa estágio-conversão (Swierzy & Lüder, 2015). Este evento demonstra que até mesmo o estágio de diferenciação da célula hospedeira é capaz de impactar na fisiologia do parasito. Adicionalmente, estudos revelam que há maior propensão na infecção durante a fase S do ciclo celular, e que *T. gondii* é capaz de induzir maior permanência de fibroblastos e mioblastos nesta fase (Molestina e cols., 2008; Lavine & Arrizabalaga, 2009; Kim e cols., 2016). Moura e cols. (2009) mostraram pela primeira vez que a diminuição da razão parasito para 1:10 (bradizoíto/célula hospedeira) causou a formação espontânea de cistos intracelulares bem definidos nas células epiteliais intestinais de felinos após 72 horas sem qualquer modulação (física, química ou imunológica) da cultura. Na presente dissertação, a ocorrência da cistogênese em enterócitos felinos foi bem caracterizada ultraestruturalmente com imagens contundentes de que a cistogênese se estabelece nesta célula epitelial. Nosso grupo já demonstrou que células epiteliais e, em particular a infecção da linhagem epitelial renal de felino, as CRFK com bradizoítos da cepa ME-49, a mesma cepa usada nesta dissertação, foi mais eficiente no estabelecimento da cistogênese quando comparada à linhagem epitelial intestinal de rato IEC-6 (de Muno e cols., 2014). Nossos dados, combinados com o fato da CEIF se diferenciar em cultura, reforçam o conceito de que a cistogênese *in vitro* é dependente de vários fatores,

incluindo a carga parasitária e o tipo celular (ou a interação destes fatores), além do estágio de diferenciação das células hospedeiras.

As condições experimentais aplicadas em nossos ensaios, utilizando bradizoítos de cepa avirulenta de *T. gondii*, como a ME49, e enterócitos de felinos nos permitiu, pelo menos em parte, obter estágios que correspondem às características morfológicas de formas esquizontes do parasito, muito semelhantes àquelas caracterizadas *in vivo* (Ferguson, 2004, 2009; Speer & Dubey, 2005). A reprodutibilidade do ciclo sexuado de Coccídeos tem sido obtido por Worliczek e cols. (2013). Os autores apontaram também a influência significativa da dose de infecção no desenvolvimento de merozoítos intracelulares de *Isospora suis* em células epiteliais suínas intestinais. Eles obtiveram uma alta densidade de merozoítos quando a razão 1:10 (parasito/célula hospedeira) foi utilizada e conseguiram inclusive, a produção de oocistos *in vitro* quando baixa carga parasitária foi empregada (1:100 e 1:200). Esses dados corroboram em parte os resultados do nosso grupo (Moura e cols., 2009) de que a infecção de CEIF com bradizoítos da cepa ME49 empregando diferentes proporções parasito/células hospedeiras foram decisivas para o destino intracelular dos parasitos nos enterócitos, em particular para a obtenção de esquizontes (1:20). Vários experimentos foram executados na tentativa de se induzir um aumento na produção de esquizontes em enterócitos de felinos, quiçá a obtenção das formas sexuais de *T. gondii*. Nesta busca utilizamos os recursos da variação da carga parasitária, mas nos deparamos com a dificuldade de infecção de um número considerável de células que nos permitissem uma análise ultraestrutural. Após várias tentativas, optamos por infectar com a carga de 1:20 e poder explorar melhor esta interação. Outra estratégia também empregada foi a redução na concentração de soro fetal bovino para 1% no meio de cultura, como sugerido por Worliczek e cols. (2013), nos ensaios com *Isospora*, mas no nosso sistema aparentemente não teve influência numa maior indução da esquizogonia.

Nossas análises por microscopia óptica de monocamadas coradas por Giemsa foram bastante estimulantes, pois as imagens dos estágios intracelulares apresentavam uma correlação morfológica estreita com a descrição dos estágios esquizontes tradicionalmente descritos no intestino de gatos infectados experimentalmente (Dubey e cols., 1970; Dubey & Frenkel, 1972; Ferguson, 2004, 2009; Speer & Dubey, 2005). O desenvolvimento dos estágios de esquizontes e a

gametogonia na parede intestinal de felinos é estabelecido, a partir da infecção com bradizoítos, iniciando-se o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii* (Dubey & Frenkel, 1972) e tem sido postulado que os bradizoítos ao penetrarem nos enterócitos desencadeiam a produção de cinco estágios enteroepiteliais, ou esquizontes distintos do parasito que se convencionou denominá-los de tipos A, B, C, D e E.

Nas nossas culturas de enterócitos, a primeira indicação de que o ciclo enteroepitelial de *T. gondii* estava se estabelecendo *in vitro* foi pela presença de grande quantidade de massas multinucleadas, diferindo do estágio taquizoíto e dos esquizontes dos tipos A e B. Estas massas multinucleadas corresponderiam a um processo de multiplicação múltipla, caracterizado como endopoligenia e/ou esquizogonia por meio da análise por microscopia óptica e confirmado por ultraestrutura como proposto por Speer e cols. (1997; 1998) e Speer & Dubey (2005). Ainda, no nosso sistema foi evidenciada a presença das massas multinucleadas correspondentes aos esquizontes do tipo C, que apresentam vários núcleos com nucléolos evidentes e muitas expansões membranares. Estes esquizontes do tipo C se caracterizam pela presença de RTV, mitocôndrias, róprias eletrondensas, lipídios de grande volume, grânulos de amilopectina e núcleos deslocados para a periferia, como bem demonstrado nas Figuras 4.26-4.28 e em concordância com as descrições de Speer & Dubey (2005). A análise comparativa das estruturas intracelulares evidenciadas nos enterócitos *in vitro* (Fig. 4.29A e B) encontram alta similaridade com as descritas por Ferguson (2009) quando analisou e caracterizou os estágios enteroepiteliais de cortes do intestino de gatos (Fig. 4.29C). Estágios mais avançados do desenvolvimento de esquizontes do tipo C em culturas de enterócitos são mostrados de forma comparativa com os cortes do tecido intestinal de gatos infectados comprovando que fomos capazes de reproduzir parte do ciclo enteroepitelial de *T. gondii in vitro*, como bem documentado na Figura 4.30A-D de imagens do artigo original de Speer & Dubey (2005) (Fig. 4.30E). Imagens bastantes representativas da endopoligenia/esquizogonia em processo de “brotamento” dos merozoítos podem ser observadas por microscopia eletrônica (Fig. 4.31A e B) e que quando comparadas com as imagens correspondentes deste tipo de esquizonte dos artigos originais de Ferguson (2009) na figura 4.31C e D é evidente a semelhança morfológica entre as estruturas.

A análise por microscopia de luz e eletrônica possibilitou identificar esquizontes do tipo D que se caracterizam também pela presença de massas multinucleadas que dão origem aos merozoítos a partir de uma divisão nuclear assimétrica que gera organismos de vários aspectos morfológicos (Dubey & Frenkel, 1972). A comparação das imagens da Fig. 4.32A-C de cultura de enterócitos com a original do artigo de Speer & Dubey (2005) de corte histológico do intestino de gato infectado mostra semelhanças de que esquizontes do tipo D estão sendo produzidos *in vitro*.

Tendo por base as raras descrições dos estágios enteroepiteliais de *T. gondii*, nossa análise por microscopia óptica foi capaz de identificar estruturas detectadas nas culturas de enterócitos que apresentaram características compatíveis com esquizontes do tipo E, pela ausência de corpo residual (Speer & Dubey, 2005) e que podem ser comparadas com o sistema *in vitro* e *in vivo* na Figura 4.33A e B, respectivamente.

Assim, sob as nossas condições experimentais, culturas de CEIF infectadas com bradizoítos de *T. gondii* revelaram estruturas muito semelhantes aos esquizontes dos tipos C, D e E de acordo com a classificação estabelecida por Dubey & Frenkel (1972) e Speer & Dubey (2005) em cortes histológicos do intestino delgado de felinos infectados por via oral com cistos de *T. gondii*.

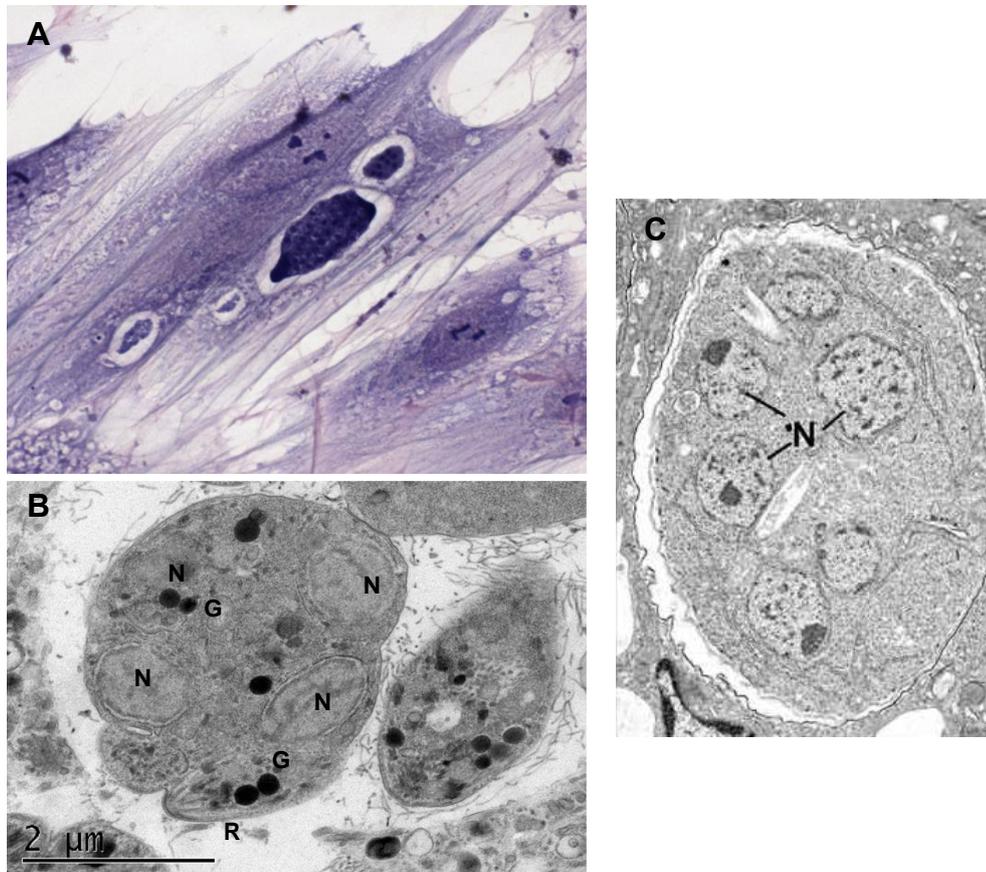


Figura 4.29: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*. (A e B) Cultura de enterócitos mostrando imagem de massa multinucleada de esquizontes do tipo C (TC) por microscopia de luz com 96 h de infecção; (B) Por Microscopia eletrônica de transmissão com 9 dias de infecção; (C) Imagem de corte de intestino de gatos infectado mostrando a massa multinucleada sendo caracterizada como esquizonte do tipo C. É evidente a semelhança morfológica entre as estruturas. Reprodução de imagem autorizada pelas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. (Ferguson 2009).

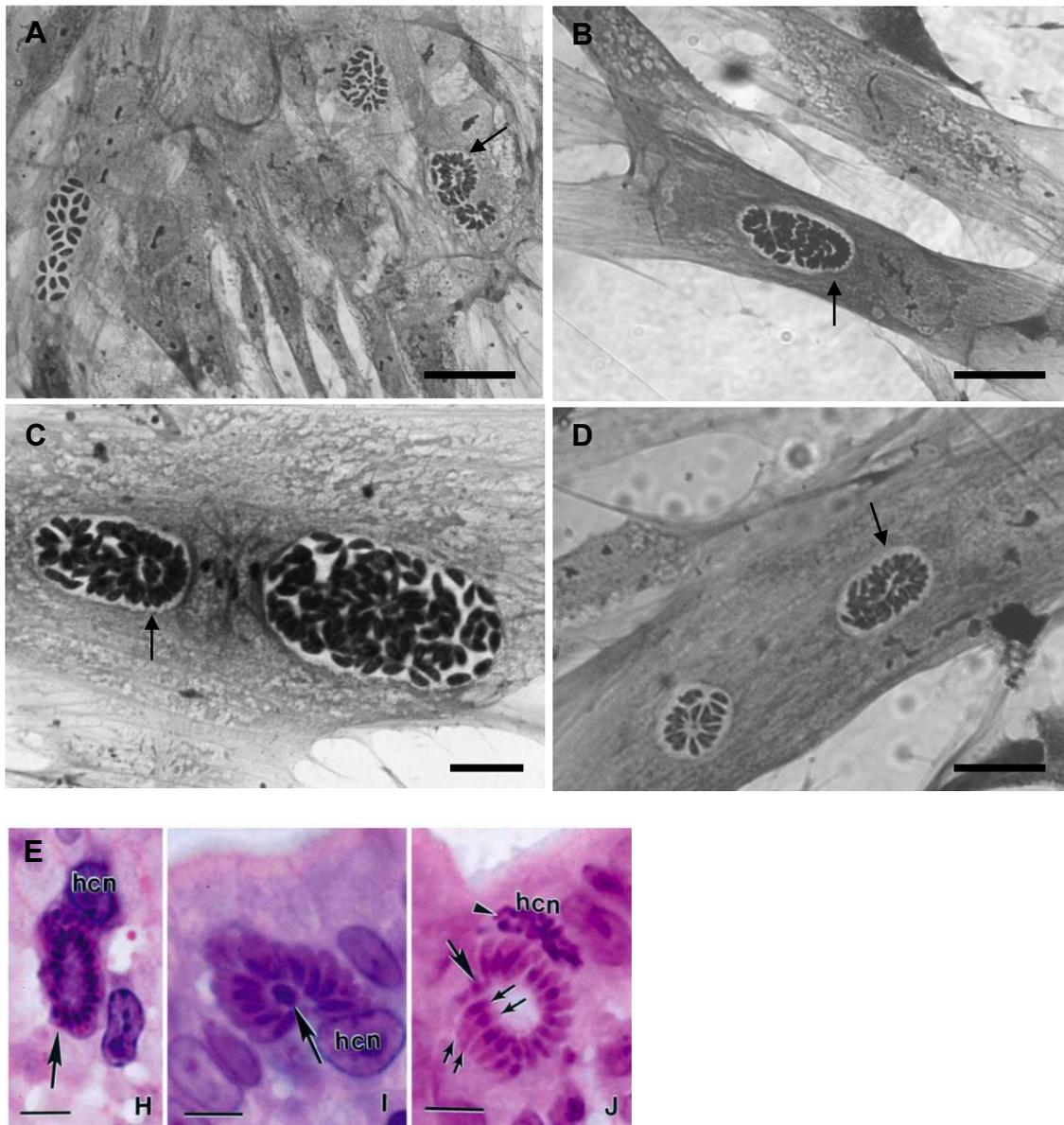


Figura 4.30: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*. (A-D) Cultura de enterócitos com 9 dias de infecção. Imagens de parasitos organizados na periferia do vacúolo vista por microscopia de luz e caracterizados como esquizontes do tipo C (setas). (E) Imagem de corte de intestino de gatos infectados mostrando imagens muito semelhantes às encontradas *in vitro* e identificados como esquizontes do tipo C. Reprodução de imagem autorizada por Speer & Dubey (2005).

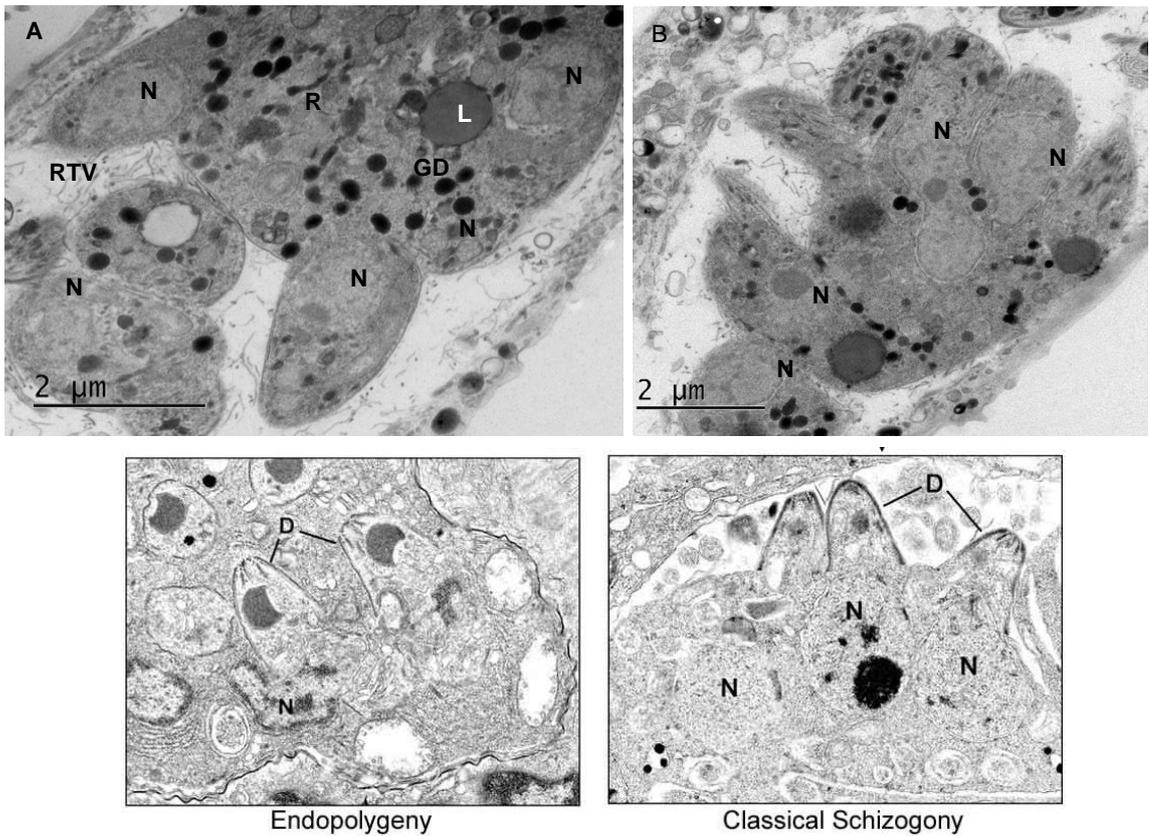


Figura 4.31: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*. (A e B) Cultura de enterócitos com 9 dias de infecção. (A e B) Imagem de massa multinucleada vista por microscopia eletrônica de transmissão mostrando estágio avançado da endopoligenia com parasitos emergindo desta estrutura que corresponde ao processo identificado em esquizontes do tipo C; (C e D) Imagens de corte de intestino de gatos infectado mostrando os processos de endopoligenia e esquizogonia clássica que ocorrem no esquizonte do tipo C. A semelhança da morfologia das estruturas é notória. Reprodução de imagem autorizada pelas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. (Ferguson 2009)

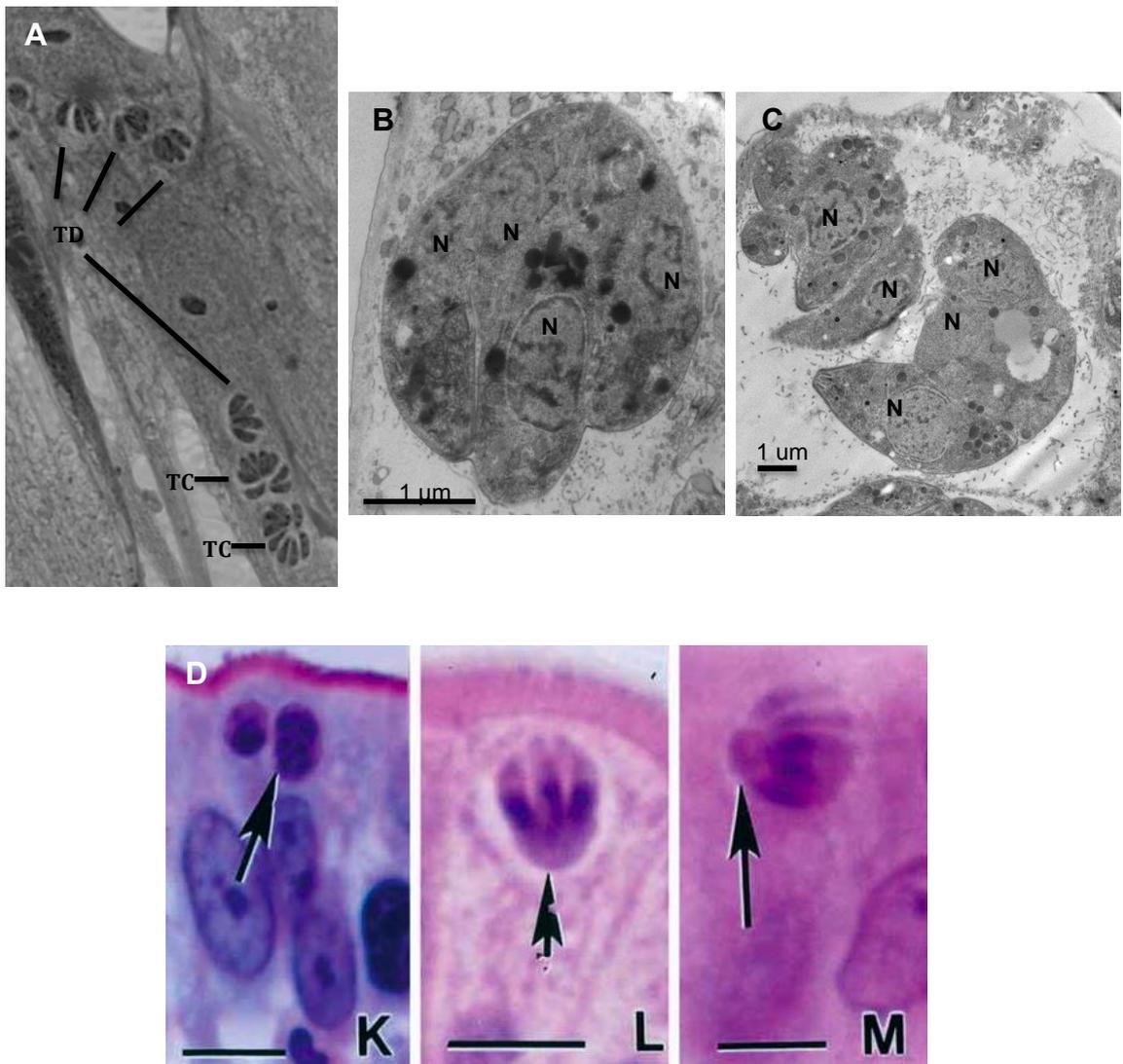


Figura 4.32: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*. (A-D) Cultura de enterócitos com 9 dias de infecção. Imagens de parasitos organizados na periferia do vacúolo vista por microscopia de luz e caracterizados como esquizontes do tipo D (TC). (E) Imagem de corte de intestino de gatos infectados mostrando imagens muito semelhantes às encontradas *in vitro* e identificados como esquizontes do tipo D. Reprodução de imagem autorizada por Speer & Dubey (2005).

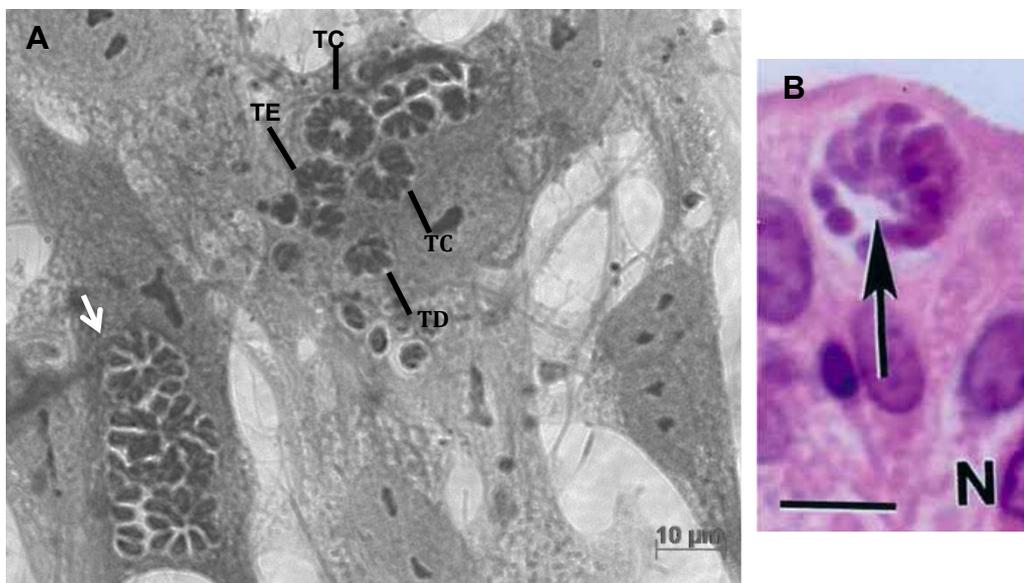


Figura 4.33: Comparação das estruturas observadas *in vitro* e *in vivo*. (A) Cultura de enterócitos com 9 dias de infecção. Imagens de parasitos organizados na periferia do VP vista por microscopia de luz, sem corpo residual e caracterizados como esquizontes do tipo E. (B) Imagem de corte de intestino de gatos infectados mostrando esquizontes do tipo E. Reprodução de imagem autorizada por Speer & Dubey (2005).

6. PERSPECTIVAS

O emprego de cultura primária de enterócitos de felinos abre novas perspectivas para investigação de aspectos biológicos e moleculares envolvidos no ciclo entérico de *T. gondii in vitro*. Além disso, possibilita agregar conhecimento para o desenvolvimento de novas estratégias direcionadas à intervenção da transmissão do parasito, com foco numa das principais vias pelas quais a toxoplasmose se propaga: pelas fezes de felinos contaminando o meio ambiente.

7. CONCLUSÕES

- O modelo células epiteliais intestinais de felinos permitiu reproduzir as três vias de destino intracelular de *T. gondii* a partir da infecção com bradizoítos da cepa ME49: ciclo lítico, cistogênese e esquizogonia por períodos que variaram de 2-9 dias de interação.
- A infecção de cultura primária de células epiteliais intestinais de felinos induziu o desenvolvimento de 3 estágios de esquizontes, identificados como tipos C, D e E, se constituindo como um modelo alternativo para o melhor entendimento do ciclo entérico de *T. gondii* sob condições controladas;
- As estratégias experimentais implementadas neste estudo mimetizaram *in vitro* o microambiente celular natural necessário para o estabelecimento, pelo menos em parte, do ciclo entérico de *T. gondii* no hospedeiro definitivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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; 125: 32-40.

Alanouti, Fatme & Tomavo, Stanislas & Parmley, Stephen & Ananvoranich, Sirinart. (2005). The Expression of Lactate Dehydrogenase Is Important for the Cell Cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 279. 52300-11.

Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 1;46(1-3):27-43.

Bader A, Hansen T, Kirchner G, Allmeling C, Haverich A, Borlak JT. Primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures to study drug oxidation reactions. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 331-42.

Barbosa HS, De Muno RM, Moura MA. O Ciclo Evolutivo. In: de Souza W, Belfort Jr R, *Toxoplasmosose & Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2013. 33-45.

Basson MD, Turowski G, Emenaker NJ. Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp Cell Res.* 1996; 225: 301–5.

Belluco S, Mancin M, Conficoni D, Simonato G, Pietrobelli M, Ricci A. Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: A systematic review and meta-regression. *PloS One.* 2016; 11: e0153856.

Belluco S, Simonato G, Mancin M, Pietrobelli M, Ricci A. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 1–12.

Blackman MJ, Carruthers VB. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16: 459-64.

Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69: 463-85.

Blumberg RS, Terhorst C, Bleicher P, McDermott FV, Allan CH, Landau SB, Trier JS, Balk SP. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 1991; 147: 2518–24.

Booth C, O'Shea JA, Potten CS. Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured adult intestinal epithelium. *Exp Cell Res.* 1999; 249(2): 359-66.

Booth C, O'Shea J (2002). Isolation and Culture of Intestinal Epithelial Cells. In: *Culture of Epithelial Cells. Second Edition.*R. Ian Freshney and Mary G. Freshney Eds. Wiley-Liss, Inc.pp. 303-33.

Boughattas S. Toxoplasma infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidences. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015b; 57: 2924-33.

Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1997; 214(3):248-57.

Buchholz KR, Bowyer PW, Boothroyd JC. Bradyzoite pseudokinase 1 is crucial for efficient oral infectivity of the *Toxoplasma gondii* tissue cyst. Eukaryot Cell. 2013; 12(3): 399-410.

Buchholz KR, Fritz HM, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Ferguson DJ, Conrad PA, Boothroyd JC. Identification of tissue cyst wall components by transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* *Toxoplasma gondii* bradyzoites. Eukaryot Cell. 2011; 10(12): 1637-47.

Caldas LA, de Souza W. A Window to *Toxoplasma gondii* Egress. Pathogens. 2018; 7(3). pii: E6

Carrière V, Lesuffleur T, Barbat A, Rousset M, Dussaulx E, Costet P, de Waziers I, Beaune P, Zweibaum A. Expression of cytochrome P-450 3A in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7. FEBS Lett. 1994; 355: 247-50.

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta trop. 2002; 81(2): 111-22.

Chopra DP, Dombkowski AA, Stemmer PM, Parker GC. Intestinal epithelial cells *in vitro*. Stem Cells Dev. 2010; 19: 131–42.

Chougule P, Herlenius G, Hernandez NM, Patil PB, Xu B, Sumitran-Holgersson S. Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method. Scand J Gastroenterol. 2012; 47(11): 1334-43.

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.

Dehkordi FS, Borujeni MRH, Rahimi E, Abdizadeh R. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. Foodborne Pathog Dis. 2013; 10: 120-5.

Delahoy MJ, Wodnik B, McAliley L, Penakalapati G, Swarthout J, Freeman MC, Levy K. Pathogens transmitted in animal feces in low- and middle-income countries. Int J Hyg Environ Health. 2018; 221(4): 661-76.

de Muno RM. *Toxoplasma gondii*-células epiteliais de felinos: novos aspectos do ciclo enteroepitelial *in vitro* [PhD Thesis]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2015. 120 pp.

de Muno RM, Moura MA, de Carvalho LC, Seabra SH, Barbosa HS. Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*. Folia Parasitol (Praha). 2014; 61(2): 113-9.

Denkers EY, Butcher BA, Bennouna S. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. Int J Parasitol. 2004; 34: 411-21.

Desmarets 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; 44: 71

de Souza W, Duarte ÉD, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. Sci Med. 2010; 20(1): 131-43.

Dubey JP. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20° C. J Parasitol. 1997; 83: 946-9.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998; 28: 1019-24.

Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Vet Parasitol. 2006; 140: 69-75.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - the first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008; 55(6): 467-75.

Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2009; 39(8): 877-82.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J Am Vet Med Assoc. 1970; 157: 1767-70.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J Protozool. 1972; 19(1): 155-77.

Dubey JP, Frenkel JK. Experimental Toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. J Parasitol. 1973; 505-12.

Dubey JP, Jones JL. Comments on "Detection of *Toxoplasma gondii* in Raw Caprine, Ovine, Buffalo, Bovine, and Camel Milk Using Cell Cultivation, Cat Bioassay, Capture ELISA, and PCR Methods in Iran". Foodborne Pathog Dis. 2014; 11: 500-1.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(2): 267-99.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol. 2010; 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, 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; 82(2): 167-81.

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; 34(3): 347-60.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(2): 133-48.

Ferguson DJ, Dubremetz JF. The ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In: *Weiss LM, Kim K, Toxoplasma gondii*. London: Academic Press; 2014. 19-59.

Fréchal K, Dubremetz JF, Lebrun M, Soldati-Favre D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15(11): 645-60.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970; 167(3919): 893-6.

Frenkel JK, Dubey JP. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis*. 1972; 126(6): 664-73.

Freyre A. Separation of toxoplasma cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. *J Parasitol*. 1995; 81: 1008-10.

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; 43: 176-85.

Gronert K, Gewirtz A, Madara JL, Serhan CN. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *J Exp Med*. 1998; 187: 1285-94.

Gross U, Bohne W, Lüder DGK, Lugert R, Seeber F, Dittrich C, Pohl F, Ferguson DJ. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*. 1996; 43: 114S-16S.

Guimarães EV, Carvalho LD, Barbosa HS. An alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 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; 94: 72-83.

Guimaraes EV, Carvalho L, Barbosa HS. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 140: 170-4.

Guo M, Dubey JP, Hill D, Buchanan RL, Gamble HR, Jones JL, Pradhan AK. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *J Food Prot.* 2015; 78: 457-76.

Hahn UR, Cho A, Schuppan D, Hahn EG, Merker HJ, Riecken EO. Intestinal epithelial cells preferentially attach to a biomatrix derived from human intestinal mucosa. *Gut.* 1987; 28 (Suppl): 153-8.

Håkansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol Biol Cell.* 1999; 10(11): 3539-47.

Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J, Blum JS, Nepom GT. Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest.* 1997; 100(1): 204-15.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(10): 634-40.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev.* 2005; 6(1): 41-61.

Huang DB, DuPont HL, Jiang ZD, Carlin L, Okhuysen PC. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11: 548-51.

Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57(1): 1-7.

Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1960; 46: 11-21.

Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan WJ. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 30: 1-9.

Kaeffer B. Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: a mini-review. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002; 38: 123-34.

Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science.* 2009; 323: 530-3.

Kedinger M, Haffen K, Simon-Assmann P. Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation.* 1987; 36(1): 71-85.

Kim MJ, Jung BK, Cho J, Song H, Pyo KH, Lee JM, Kim MK, Chai JY. Exosomes Secreted by *Toxoplasma gondii*-Infected L6 Cells: Their Effects on Host Cell Proliferation and Cell Cycle Changes. *Korean J Parasitol.* 2016; 54(2): 147-54.

Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 1101-8.

Lavine MD, Arrizabalaga G. Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2009; 164(1): 95-9.

Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL, Toivio-Kinnucan MA. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol.* 1991; 77: 126-32.

Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* 2002; 18(5): 198-201.

Mac Donal O, Chediack JG, Caviedes-Vidal E. Isolation of epithelial cells, villi and crypts from small intestine of pigeons (*Columba livia*). *Biocell.* 2008; 32(3): 219-27.

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; 74(12) :5597-603.

Massie GN, Ware MW, Villegas EN, Black MW. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Vet Parasitol.* 2010; 169(3-4): 296-303.

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; 114: 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; 59-67.

Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR, Jessup DA, Boothroyd JC, Brownstein D, Conrad PA. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol.* 2004; 34(3): 275-84.

Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiol.* 2008; 10(5): 1153-65.

Mordue DG, Håkansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol.* 1999; 92(2): 87-99.

Moura MA. Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* em culturas de células de epitélio intestinal de gato doméstico *Felis catus* (Linnaeus, 1758) [PhD Thesis]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2008. 162 pp.

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; 104: 862-4.

Moyer MP, Dixon PS, Culpepper AL, Aust JB. Colon Cell Cancer. San Diego: Academic Press; 1990. 572 pp.

Muñiz-Hernández S, González del Carmen M, Mondragón M, Mercier C, Cesbron MF, Mondragón-González SL, González S, Mondragón R. Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *BioMed Res Int.* 2011; 2011.

Nagamune K, Moreno SN, Chini EN, Sibley LD. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem.* 2008; 47: 70-81.

Opitz C, Soldati D. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 2002; 45(3): 597-604.

Parlesak A, Haller D, Brinz S, Baeuerlein A, Bode C. Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand J Immunol.* 2004; 60: 477-85.

Perreault N, Beaulieu JF. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1998; 245: 34-42.

Perreault N, Beaulieu JF. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Research.* 1996; 224(2): 354-64.

Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(3): 141-53.

Plattner H, Sehring IM, Mohamed IK, Miranda K, De Souza W, Billington R, Genazzani A, Ladenburger EM. Calcium signaling in closely related protozoan groups (Alveolata): non-parasitic ciliates (*Paramecium*, *Tetrahymena*) vs. parasitic Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma*). *Cell Calcium.* 2012; 51(5): 351-82.

Podolsky DK. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol.* 1993; 264: G179-86.

Popiel I, Gold MC, Booth KS. Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Parasitol.* 1996; 82: 330-2.

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 Rad Biol.* 1994; 65(1): 71-8.

Quaroni A. Crypt cell development in newborn rat small intestine. *J Cell Biol.* 1985; 100(5): 1601-10.

Quaroni A, Beaulieu JF. Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterol.* 1997; 113: 1198-213.

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; 80(2): 248-65.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25(2): 264-96.

Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 1986; 68: 1035–40.

Rusu D, Loret S, Peulen O, Mainil J, Dandrifosse G. Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures. *BMC Cell Biol.* 2005; 6: 42.

Sanderson IR, Ezzell RM, Kedinger 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; 93(15): 7717-22.

Sansonetti P. Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut.* 2002; 50 (suppl 3):iii 2-8.

Schmidt RF, Thews G. *Physiologie des Menschen.* Chapter. 1995; 23: 472-98.

Siddiqui KM, Chopra DP. Primary and long-term epithelial cell cultures from human fetal normal colonic mucosa. *In vitro.* 1984; 20: 859-868.

Shen L, Turner JR. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: G577-82.

Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23: 241–56.

Speer CA, Dubey JP, Blixt JA, Prokop K. Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles, and the transformation of sporozoites to tachyzoites of the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1997; 83: 565-74.

Speer CA, Clark S, Dubey JP. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1998; 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; 35(2): 193-206.

Strater J, Wedding UL, Barth TF, Koretz KA, Elsing CH, Moller PE. Rapid onset of apoptosis *in vitro* follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology.* 1996; 110(6): 1776-84.

Strober W. Interactions between epithelial cells and immune cells in the

intestine. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 859: 37–45.

Stutzmann J, Bellissent-Waydelich A, Fontao L, Launay JF, Simon-Assmann P. Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech.* 2000; 51: 179–90.

Su C. Recent expansion of toxoplasma through enhanced oral transmission. *Science.* 2003; 299: 414-17.

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; 17(1): 2-17.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13): 1217-58.

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.

VanWormer E, Carpenter TE, Singh P, Shapiro K, Wallender WW, Conrad PA, Largier JL, Maneta MP, Mazet JA. Coastal development and precipitation drive pathogen flow from land to sea: evidence from a *Toxoplasma gondii* and felid host system. *Sci. Rep.* 2016; 6: 29252.

Walker WA. Development of the intestinal mucosal barrier. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002; 34: S33-9.

Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 2000; 5: D391.

Weng XH, Beyenbach KW, Quaroni A. Cultured monolayers of the dog jejunum with the structural and functional properties resembling the normal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288: G705–17.

Whitehead RH, Jones JK, Gabriel A, Lukies. A. A new colon carcinoma cell line (LIM1863) that grows as organoids with spontaneous differentiation into crypt-like structures in vitro. *Cancer Res.* 1987; 47: 2683-9.

WHO. 2014. WHO estimates of the global burden of diseases. WHO 46:1– 15. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.009>