

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

***Toxoplasma gondii* - célula muscular esquelética: aspectos  
estruturais e moleculares nos sistemas *in vitro* e *in vivo***

por

***ALESSANDRA FERREIRA GOMES***

Rio de Janeiro  
Março de 2011

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

***Toxoplasma gondii*-célula muscular esquelética: aspectos  
estruturais e moleculares nos sistemas *in vitro* e *in vivo***

por

***ALESSANDRA FERREIRA GOMES***

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

Orientadora: Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro  
Março de 2011

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

Esta tese intitulada:

***Toxoplasma gondii*-célula muscular esquelética: aspectos estruturais e  
moleculares nos sistemas *in vitro* e *in vivo***

Apresentada por:

***ALESSANDRA FERREIRA GOMES***

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Dra. Patricia M. R. Silva Martins - Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz - Presidente

---

Dra. Laís de Carvalho - Instituto de Biologia /UERJ

---

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

---

Dr. Erick Vaz Guimarães - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz (suplente)

---

Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz (suplente)

## FICHA CATALOGRÁFICA

*Gomes, Alessandra Ferreira*

*Toxoplasma gondii*-célula muscular esquelética: aspectos estruturais e moleculares nos sistemas *in vitro* e *in vivo*

Rio de Janeiro, IOC, Fiocruz, 2011.

xii, 104p.; 29,7 cm

Dissertação: Doutorado em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

Bibliografia: Pág. 189 – 208

1. *Toxoplasma gondii*; 2. Caderina; 3. Miogênese; 4. Lipídios; 5. Interação *T. gondii*-célula muscular esquelética

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Edital Universal MCT/CNPq nº 014/2008

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

Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES IV

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

Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - Fiocruz

Data da matrícula no Programa de Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: março de 2007

Ensina-me Senhor amar o meu próximo...  
...como você mesmo me amou.

Dedico esta tese ao autor  
e consumidor da minha fé,  
Jesus Cristo

## AGRADECIMENTOS

- Ao autor da minha vida, Jesus Cristo. E que minha alegria seja para onde eu for um ato de gratidão a ti Senhor...
- A minha orientadora, que amo e admiro, profundamente... Você Helene, para mim é sinônimo de força de vontade e de luta pela vida, obrigado por tudo que você me ensinou e pelo exemplo que me formou.
- A minha família por tanta confiança e amor.
- Ao meu amado filho Emanuel... o que mais poderia pedir a DEUS? Você já existe...
- A Andréa Henriques, se DEUS levantou você para me abençoar, imagine quem Ele não fará por você!
- A você Erick, eu agradeço profundamente, meu amigo, a força que Deus te deu e sua perseverança, me emocionam, conte sempre comigo.
- A Sandra Maria, pelo exemplo de força de vontade em querer me ajudar. "Bem aventurado os homens de boa vontade". Obrigado por tudo!
- As minhas amigas e irmãs: Juliana Leite, Márcia de Jesus, Reginelena, Silvana Martins, Mariele Delfim, Cláudia Clavet, Renata Morley, Renata Soares, Dayse Teixeira e Tatiana Galvão, eu amo tanto vocês que esta folha não daria para colocar tudo que esta em meu coração neste momento, nunca me esquecerei do amor que está entre nós...
- Ao Genésio e José Lopes, meus amigos, eu gostaria poder com palavras expressar o que sinto por vocês dois. Muito obrigada por tudo, por tudo mesmo..., continuem sendo "canal" de alegria e de bênção na vida de todos que cercam vocês.



# ÍNDICE

---

<b>RESUMO</b>	<b><i>xi</i></b>
<b>ABSTRACT</b>	<b><i>xii</i></b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1. Considerações gerais	01
2. Biologia do <i>Toxoplasma gondii</i>	02
2.1. Ciclo de vida e transmissão	02
3. Toxoplasmose	05
3.1. Toxoplasmose congênita	06
4. Interação <i>Toxoplasma gondii</i> - célula hospedeira	07
4.1. Participação das organelas secretoras do <i>T. gondii</i> e o vacúolo parasitóforo	08
5. Tecido muscular	11
5.1. Origem e fatores envolvidos na miogênese e regeneração muscular	11
5.2. Citoesqueleto e miofibrilogênese	14
6. Associações e especializações do citoesqueleto x membrana plasmática	17
6.1. Junções aderentes - caderinas	18
6.2. Costâmeros	21
7. Miopatias musculares	22
8. Manobras do <i>T. gondii</i> e a resposta celular frente à infecção	23
8.1. Corpúsculos lipídicos	23
8.2. Síntese de Interleucina-12 e Interferon- $\gamma$	24
8.3. Via de sinalização do Interferon- $\gamma$	27
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>

<b>III. RESULTADOS</b>	
<b>ARTIGO 1</b>	<b>31</b>
<b>ARTIGO 2</b>	<b>69</b>
<b>ARTIGO 3</b>	<b>108</b>
<b>RESULTADOS SUPLEMENTARES</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>157</b>
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>168</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>187</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>189</b>

## RESUMO

O *Toxoplasma gondii* parasito intracelular obrigatório tem como nicho durante a fase crônica da infecção, o músculo e o cérebro, o que justifica o emprego de culturas primárias de células musculares esqueléticas (CME) como modelo de estudo da toxoplasmose experimental. Os objetivos e resultados desta tese foram: (1) analisar a capacidade infectiva do *T. gondii* em CME durante a miogênese e seu efeito neste processo. Taquizoítos invadem 43% das células da cultura e mioblastos infectados inibem em 75% a formação de miotubos, afetando assim a miogênese. A expressão da molécula de adesão caderina foi modulada negativamente com diminuição expressiva do gene M-caderina em células infectadas; (2) Investigar o citoesqueleto em CME infectadas com *T. gondii*. A infecção de CME causou remodelamento de tubulina, desarranjo de filamentos de actina e reorganização de miosina. Testes por RT-PCR não mostraram significativa mudança na síntese de mRNA para desmina durante a interação. Ensaio bioquímico por Western blot mostraram uma redução da expressão da proteína desmina. O rompimento das barreiras físicas durante o escape do parasito da célula hospedeira garante novos ciclos celulares; (3) Correlacionar os dados experimentais das más formações congênitas observadas *in vivo* com o distúrbio da miogênese verificada *in vitro*. Análises histopatológicas apontam a interferência do *T. gondii* no desenvolvimento embrionário do tecido muscular revelando a formação de miofibras menores, com menos densidade de material citoplasmático e maior espaço intermiofibrilar; (4) Investigar a resposta celular de CME frente infecção pelo *T. gondii*. Nós demonstramos que a infecção leva a um aumento no número de corpúsculos lipídicos (CL), os CL interagem com o retículo sarcoplasmático e o citoesqueleto de actina. Por análise ultraestrutural foi visto que CL em contato direto com a membrana do vacúolo parasitóforo e dentro da matriz vacuolar, em torno e interagindo diretamente com a membrana do parasito, indicando que CL são recrutados e liberam seu conteúdo para dentro do PV. Houve um aumento nos níveis de mRNA da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), nas primeiras horas de interação *T.gondii*-CME e um aumento na síntese de prostaglandina-E<sub>2</sub> de 6 a 48 h de interação. Nós observamos um aumento na produção das citocinas interleucina-12 e interferon- $\gamma$  em CME infectados. Nós sugerimos que o parasito modula a resposta celular de CME infectadas e deve contribuir para o estabelecimento e manutenção na fase crônica da infecção na célula muscular.

## ABSTRAT

The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* has as niche during the chronic phase of infection, the muscle and brain, which justifies the use of primary cultures of skeletal muscle cells (SkMC) as a model of experimental toxoplasmosis. The aims and results of this study were: (1) analyze the infective capacity of *T. gondii* tachyzoites in SkMC during myogenesis and their effect on this process. Tachyzoites invaded 43% of the cell cultures and infected myoblasts inhibited in 75% the formation of myotubes, affecting the myogenesis. The cadherin (adhesion molecule) expression was downregulated in infected cells with substantial decrease in the M-cadherin gene; (2) Investigate the cytoskeleton organization in CME-*T. gondii* infected. The infection of SkMC causes remodeling of tubulin, disassembly of actin filaments and myosin reorganization. RT-PCR tests not showed significant change in the desmin mRNA synthesis during interaction. Biochemical assays by Western blot showed a reduction of the desmin protein expression. Physical barriers disruption during parasite egress from the host cell ensure new cellular cycles; (3) Correlate the experimental data *in vivo* showing congenital malformations with myogenesis disorder observed *in vitro*. Histopathological analysis showed *T. gondii* interference in the embryonic development of muscle tissue revealing smaller myofibers formation, with less ocytoplasmic material density and greater intermyofibrillary space, (4) Investigate the SkMC cellular response against *T. gondii* infection. We demonstrated that the infection leads the numbers increase of lipid bodies (LB), the LB interact closely with sarcoplasmatic reticulum and actin cytoskeleton. By ultrastructural analysis was observed LB in direct contact with parasitophorous vacuole membrane, within vacuolar matrix, around and interacting directly with parasite membrane, indicating that LB are recruited and deliveries its content inside the PV. There was COX-2 mRNA levels increase in the first hour of *T. gondii*-SkMC interaction and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis increase from 6 h up to 48 h of infection. We observed also production increase of the cytokines interleukin-12 (IL-12) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in infected SkMC. We suggest that the parasite modulates SkMC cellular response and it might contribute to the establishment and maintenance of chronic phase of infection in muscle cell.

# INTRODUÇÃO

## 1. Considerações gerais

*Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, é um protozoário parasito intracelular obrigatório e o agente causador da toxoplasmose, uma das zoonoses mais comuns no mundo. O *T. gondii* pode ser transmitido por via transplacentária, fecal-oral ou por carnivorismo (Frenkel e cols., 1970; Hill e cols., 2005). O *T. gondii* é capaz de infectar e se multiplicar em qualquer célula nucleada de mamíferos ou aves (Dubey, 1998a).

A infecção de hospedeiros definitivos pode ocorrer pela ingestão de carne infectada contendo cistos teciduais de *T. gondii*, que se rompem pela ação do suco gástrico, levando à liberação de bradizoítos que invadem células do trato intestinal, dando início à fase de multiplicativa assexuada por endodiogenia (Tenter e cols., 2000). Os cistos teciduais são responsáveis pela fase crônica da doença, pela manutenção do parasito nos tecidos para estabelecimento da doença e também pela possibilidade de reativação da infecção (Lyons e cols., 2002). O encistamento do *T. gondii* (conversão das formas taquizoítos para bradizoítos) ocorre principalmente no cérebro e músculos, podendo persistir por toda a vida dos hospedeiros intermediários e definitivos (Dubey e Frenkel, 1976; Dubey, 1998a, Tenter e cols., 2000). Atualmente, cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo encontram-se cronicamente infectadas pelo *Toxoplasma* com conseqüências desconhecidas (Prandota, 2009).

Pouca atenção tem sido dada ao músculo esquelético no estudo da toxoplasmose experimental, apesar de sua participação na fase crônica da doença (Remington & Cavanaugh, 1965), nos indivíduos imunocomprometidos infetados pelo vírus HIV (Gherardi e cols., 1992) e como importante veículo de disseminação da doença, através da ingestão de carne contaminada (Dubey, 2004). A aplicação do músculo esquelético como modelo de estudo da toxoplasmose, abre novas perspectivas para o entendimento da biologia do parasito e de sua interação com uma das células de eleição para o estabelecimento da cistogênese *in vivo* (Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005; Ferreira-da-Silva e cols., 2008, 2009a,b; Guimarães e cols., 2008, 2009).

## 2. Biologia do *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* foi identificado simultaneamente em 1908 por Nicolle e Manceaux trabalhando no norte da África e por Splendore no Brasil. Trata-se de um coccídeo intestinal de felídeos (hospedeiros definitivos), com uma ampla variedade de hospedeiros intermediários, como animais de sangue quente, incluindo o homem. Ao longo do processo evolutivo tornou-se bem adaptado à vida parasitária, invadindo eficientemente qualquer célula nucleada de seus hospedeiros (Appleford e Smith, 1997).

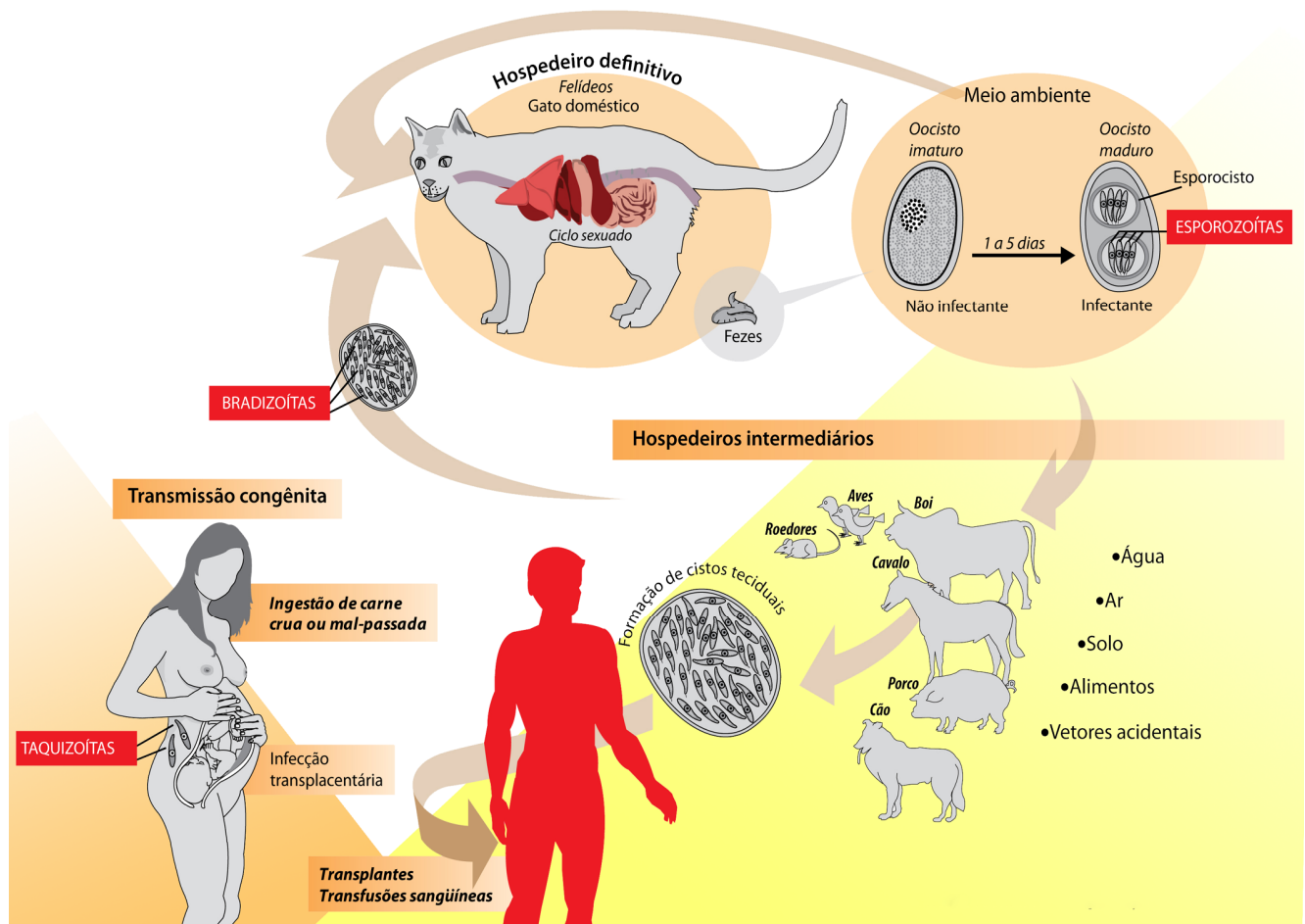
O *T. gondii* apresenta três formas infectivas: a) Taquizoítos - medem cerca de 2  $\mu\text{m}$  de largura por 5  $\mu\text{m}$  de comprimento e se multiplicam por endodiogenia no interior de vacúolos parasitóforos (VP), formando rosetas e lisando a célula hospedeira caracterizando assim, o ciclo lítico do parasito (Dubey e cols., 1998). Durante a fase aguda da infecção são encontrados no interior de várias células nucleadas envolvidos pela membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (Tenter e cols., 2000) e também no interior do núcleo da célula, onde a MVP não foi observada (Barbosa e cols., 2005); b) Bradizoítos - encontrados no interior de cistos teciduais. Os cistos variam de tamanho podendo medir 5-300  $\mu\text{m}$  de diâmetro e contem centenas de bradizoítos, medindo cerca de 8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2  $\mu\text{m}$  de largura. Estas formas se multiplicam mais lentamente, também por endodiogenia. Os bradizoítos são resistentes à digestão péptica e sobrevivem várias horas após a exposição às enzimas digestivas (Dubey, 1998b; Dubey e cols., 1998) e, c) Esporozoítos - formas encontradas no interior de oocistos esporulados que são liberados nas fezes dos felídeos, como produto da reprodução sexuada que ocorre no intestino delgado de seus hospedeiros definitivos (Elmore e cols., 2010). Após a esporulação no ambiente entre 1 a 21 dias, o oocisto passa a apresentar dois esporocistos com quatro esporozoítos em seu interior, medindo cerca de 6-8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2  $\mu\text{m}$  de largura (Dubey e cols., 1998).

## **2.1. Ciclo de vida e transmissão**

Nos membros da família Felidae, representantes dos hospedeiros definitivos, o desenvolvimento sexuada do *T. gondii* ocorre somente no intestino, ao passo que a replicação assexuada ocorre em todos os hospedeiros definitivos e intermediários (Moura e cols., 2009). Os felídeos eliminam oocistos de *T. gondii* nas fezes, normalmente de 3 a 10 dias depois da ingestão de bradizoítos, 13 ou mais dias após a ingestão de taquizoítos, 18 ou mais dias após a ingestão de oocistos esporulados

(Dubey e Frenkel, 1976). Os oocistos, eliminados no ambiente sob condições ideais de oxigênio, umidade e temperatura formam os esporocistos, cada um apresentando quatro esporozoítos. Após amadurecimento, os oocistos no ambiente, passam a ser infectivos, podendo ser ingeridos por animais suscetíveis tais como, aves e mamíferos, incluindo o homem (Dubey e cols., 1998). O felino na fase aguda da infecção pode liberar cerca de 100 milhões de oocistos através das fezes, e estes podem ser dispersos no ambiente por fatores como vento, chuva, insetos e minhocas (aderidos em suas cerdas ou no trato digestivo destes animais) (Tenter e cols., 2000).

Uma das vias da infecção dos hospedeiros definitivos sadios ocorre pela ingestão de carne contendo cistos teciduais (Fig. 1), que se rompem pela ação do suco gástrico, levando à liberação de bradizoítos que invadem as células do trato intestinal, iniciando-se a fase de multiplicação assexuada por endodiogenia (Tenter e cols., 2000). Esta forma de reprodução caracteriza-se por gerar duas novas células filhas, a partir da célula mãe a cada ciclo mitótico (Sheffield e Melton, 1968). Outra trajetória do desenvolvimento do parasitismo no hospedeiro definitivo, os felinos, é o ciclo entérico, com o estabelecimento de cinco estágios distintos, formados no interior dos enterócitos dos felinos. Exclusivamente nestas células ocorre a fase sexuada (gametogônia) com a formação de gamontes que darão origem aos gametas. Os microgametas (gametas masculinos) são móveis e flagelados que evadem da célula hospedeira para fecundar o gameta feminino que permanece no interior da célula. Após a fusão dos gametas ocorre a formação do zigoto envolto por uma parede e passa a ser chamado oocisto não esporulado. Após o rompimento da célula, o oocisto não esporulado é então liberado na luz intestinal e juntamente com as fezes é eliminado no ambiente (Frenkel e cols., 1970; Dubey e Frenkel, 1972) (Fig. 1).



Moura e cols. (2009)

**Figura 1: Ciclo de vida e transmissão do *Toxoplasma gondii***

O *T. gondii* é capaz de infectar e se multiplicar em qualquer célula nucleada de mamíferos ou aves (Dubey, 1998a). Após a invasão das células, os parasitos são encontrados em um compartimento intracelular chamado vacúolo parasitóforo. A replicação do *Toxoplasma* coincide com um significativo aumento da área da membrana denominada membrana do vacúolo parasitóforo (Charron e Sibley, 2002). O taquizoíto multiplica-se por endodiogenia cerca de 7-10 horas após a invasão e esta replicação leva à lise da célula após 48 horas de infecção (Hu e cols., 2002).

Devido à influência de alguns fatores ainda não bem esclarecidos que envolvem provavelmente imunológicos, ocorre a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos, ainda no interior do vacúolo parasitóforo. Os bradizoítos tem a propriedade de alterar a composição da membrana do vacúolo parasitóforo, constituindo a parede cística, dando origem aos cistos teciduais, responsáveis pela fase crônica da doença (Dubey, 1998a; Tenter e cols., 2000). Os cistos podem persistir por toda a vida dos hospedeiros intermediários e definitivos. A manutenção



do parasito nos tecidos é importante para o estabelecimento da doença, sendo também responsável pela possibilidade de reativação da infecção devido à imunossupressão do hospedeiro, levando à ruptura dos cistos teciduais com a liberação das formas bradizoítas (Lyons e cols., 2002).

Os cistos podem ser formados nos tecidos cerca de sete dias após a infecção e permanecem viáveis por toda vida do indivíduo. Dependendo da cepa de *T. gondii*, nem o congelamento das carnes contaminadas pode evitar a infecção (Tenter e cols., 2000), enquanto a sua exposição a altas temperaturas como 67° C (ou superior) afeta a viabilidade dos parasitos (Dubey e cols., 1990).

Outra via de infecção é através da transmissão transplacentária dos taquizoítos (Dubey, 1991). Embora a infecção fetal ocorra com mais frequência na fase aguda da infecção em gestantes, esta também pode ocorrer após a reativação da infecção latente. Em muitos hospedeiros, taquizoítos podem ser também transmitidos pelo leite da mãe para sua prole (Dubey e cols., 1998). Assim, o *T. gondii* pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário ou vice-versa, bem como entre os hospedeiros definitivos e entre os hospedeiros intermediários (Tenter e cols., 2000).

O *T. gondii* é considerado um parasito promíscuo devido a sua grande capacidade de infectar e se multiplicar em uma série de hospedeiros em todo mundo (Dubey, 2008). A disseminação da toxoplasmose pode ocorrer também por transplante de órgãos ou medula óssea, infectados com o *T. gondii* a um receptor susceptível, ou pela reativação de uma infecção latente no próprio transplantado, devido ao tratamento imunossupressor (Jackson e Hutchison, 1989; Ho-Yen e cols., 1992).

### **3. Toxoplasmose**

A toxoplasmose é uma doença que pode afetar todos os animais de sangue quente, incluindo os humanos. A patogenicidade do *T. gondii* é determinada por muitos fatores como: susceptibilidade da espécie hospedeira, estágio da infecção (aguda ou crônica) e virulência da cepa do parasito. No caso de infecções produzidas por oocistos (transmitido por via fecal-oral), estas são clinicamente mais graves em hospedeiros intermediários, sendo dose dependente (Tenter e cols., 2000; Dubey, 2004; 2008).

#### **3.1. Toxoplasmose congênita**

A toxoplasmose congênita é uma das mais sérias conseqüências da infecção aguda causada pelo *Toxoplasma*. A transmissão do *T. gondii* da mãe para o feto é considerada mais eficiente durante o último trimestre de gravidez, mas a doença é mais severa se a transmissão ocorrer durante o primeiro trimestre de gestação. Quando a mulher se infecta pela primeira vez, durante a gravidez, a resposta imune materna parece proteger a mãe, mas não o feto (Wong e Remington, 1994). No entanto, não existem dados sobre a taxa de transmissão congênita do *Toxoplasma* com relação à idade gestacional em qualquer hospedeiro durante uma infecção natural (Dubey e cols., 2008). A infecção aguda pelo *T. gondii* é assintomática na maioria das mulheres grávidas, mas quando sintomática a manifestação clínica mais comum é a linfadenopatia (Weiss e Dubey, 2009).

O parasito pode causar aborto (9% das gestantes infectadas) ou má formação do feto (30% das crianças nascidas de mães infectadas). Com relação às gestantes, apesar dos cuidados indicados para se evitar possíveis contatos com as formas infectantes, estudos mostram que o maior fator de risco na América do Norte e na Europa é a ingestão de carne e derivados contaminados com cistos teciduais, seguido da infecção pela água e alimentos contaminados com oocistos (Cook e cols., 2000; Jones e cols., 2003; Jones e Dubey, 2010). Quase dois terços dos recém nascidos portadores do toxoplasma são assintomáticos logo que nascem, mas podem desenvolver posteriormente microcefalia, hidrocefalia, coriorretinite, cegueira, deficiências psicomotoras ou neurológicas, convulsões, retardo mental e surdez (Tenter e cols., 2000; Weiss e Dubey, 2009).

Os maiores danos patológicos da toxoplasmose ocorrem quando o sistema imune do hospedeiro está comprometido e o parasito é reativado de seu estágio de latência (cistos teciduais), no cérebro, retina, miocárdio e músculo esquelético (Hill e Dubey, 2002). Este parasito tem sido estudado na origem das miopatias inflamatórias durante anos, mas os parasitos não são facilmente detectados no músculo. É descrito, no entanto, que a toxoplasmose pode causar miosites, quer por infecção recente ou reativação de cistos teciduais (Hassene e cols., 2008). Esses dados associados com a importância que a carne contaminada tem na transmissão da toxoplasmose, justificam plenamente o estudo da interação do *T. gondii*- e célula muscular.

Nas duas últimas décadas tem aumentado o interesse de se estudar as condições necessárias para conversão de taquizoítos para bradizoítos e vice-versa e

a reativação de cistos teciduais (Frenkel, 1996; Gross e cols., 1996; Bohne e Roos, 1997). Nos indivíduos imunocomprometidos, principalmente em pacientes com AIDS, a gravidade da infecção por *Toxoplasma* é uma das principais causas de morte (Black e Boothroyd, 2000). Estudos comprovam que mais de 40% destes indivíduos são acometidos por quadros graves de encefalite por toxoplasma (Tenter e cols., 2000). A encefalite ocorre quando a contagem de células CD4+ está abaixo de 200 células/microlitro. Com a reconstrução imune devido à ativa terapia anti-retroviral, a incidência de toxoplasmose caiu dramaticamente nos pacientes infectados pelo HIV (Weiss e Dubey, 2009).

A encefalite é consequência da reativação de infecção latente, isto é, dos cistos teciduais. As manifestações clínicas incluem alterações do estado mental, convulsões, fraqueza, distúrbios de nervos cranianos, alterações sensoriais, distúrbios do movimento e distúrbios neuropsiquiátricos. Além de manifestações visuais graves como a retinocorioidite, pode levar desde uma hipervascularização do vítreo à necrose da retina, com perda total da visão (Holland, 1989; Morhun e cols., 1996). Manifestações pouco frequentes também são descritas nestes pacientes imunocomprometidos com toxoplasmose, como diabetes insipidus, síndrome de secreção inadequada de hormônio antidiurético, miocardites, miosites e polimiosites (Gheradi e cols., 1992; Weiss e Dubey, 2009).

As atuais terapias com drogas (sulfadiazina com pirimetamida) atuam efetivamente sobre a forma taquizoíta (fase aguda), sendo menos eficazes ou não exercem efeito sobre as formas bradizoítas (fase crônica). Desta forma, os efeitos tóxicos dessas drogas juntamente com a falta de capacidade de eliminar a infecção, indicam à necessidade de introdução de tratamentos mais efetivos e seguros (Derouin, 2001; Dubey, 2008). Embora alguns grupos estejam atuando na busca de novos compostos que possam ser efetivos contra as formas císticas, os avanços tem sido ainda muito limitados (Martins-Duarte e cols., 2010).

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

O *T. gondii* e todos os membros do filo Apicomplexa são parasitos intracelulares obrigatórios que necessitam invadir as células e migrar através dos tecidos. Na ausência de pseudópodes, cílios ou flagelos, os parasitos deste Filo usam um modo incomum de motilidade, dependente do substrato para invadir a célula, chamado de motilidade por deslizamento ("gliding motility") (Sibley e cols.,

1998). O processo de entrada é altamente orquestrado e dirigido pela maquinaria de actina-miosina do parasito (Dobrowolski e cols., 1997). Parasitos que conseguem vencer essas barreiras biológicas integram os patógenos de maior importância para o homem, sob o ponto de vista patológico (Barragan e Sibley, 2003; Sibley, 2004).

Membros do filo Apicomplexa infectam células por processos que requerem uma coordenada seqüência de eventos moleculares durante a sua interação com a célula hospedeira: ligação receptor-ligante, transdução de sinais, mobilização do motor actina-miosina, regulação da exocitose das organelas secretoras e modificação proteolítica das proteínas de superfície do parasito. Vários detalhes da invasão diferem amplamente dependendo do gênero, espécie, estágio evolutivo e célula hospedeira, mas os mecanismos básicos são provavelmente conservados no filo (Carruthers e Blackman, 2005).

As etapas de adesão e invasão na célula hospedeira são estratégias cruciais para o *T. gondii* estabelecer a infecção. A penetração do parasito requer que seu pólo anterior (conóide) entre em contato com a superfície da célula hospedeira para desencadear a invaginação da membrana celular. A invasão (15 - 17 segundos) acontece de uma maneira muito mais rápida que a fagocitose (120 segundos), o que sugere participação ativa do parasito neste processo (Nichols e O'comor, 1981). Já o egresso requer que os parasitos arranjados em forma de roseta se separem uns dos outros para atravessar a MVP, o citosol, a malha do citoesqueleto da célula hospedeira e finalmente a membrana plasmática, para atingir o espaço extracelular (Caldas e cols., 2010). A travessia do citoplasma do hospedeiro é descrita como um evento traumático, que conduz ao processo de lise celular (Black e Boothroyd, 2000).

Recentes modelos experimentais vêm contribuindo para a descoberta de novos aspectos da biologia de disseminação do parasito (Lambert e Barragan, 2010).

#### **4.1. Participação das organelas secretoras do *T. gondii* x vacúolo parasitóforo**

Além do conóide, o *Toxoplasma* possui organelas secretoras como róptrias, micronemas e grânulos densos que desempenham um importante papel na invasão e manutenção do parasito na célula hospedeira (Joiner e Ross, 2002). A formação e o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo (VP) envolve o reconhecimento da célula hospedeira e a ativa invasão do parasito, com secreção de proteínas dos

micronemas e róptrias, levando à formação de um vacúolo não fusogênico onde um único parasito passa por vários ciclos de divisão (Jones e Hirsch, 1972). As róptrias e os micronemas estão localizados na porção anterior do parasito, enquanto os grânulos densos estão distribuídos por todo citoplasma (Joiner e Roos, 2002; Monteiro e cols., 2001; Boothroyd e Dubremetz, 2008). Inicialmente a secreção dos micronemas parece garantir a adesão seletiva do parasito à membrana plasmática da célula hospedeira. Diversas proteínas identificadas nos micronemas, em conjunto com proteínas associadas, como por exemplo, a TgMIC2AP, formam complexos adesivos que contém diversas moléculas semelhantes à integrinas, EGF, trombospondinas e lectinas que reconhecem receptores na superfície de diversas células, como heparan sulfato, proteoglicanas e lamininas (Tuckwell e Hamphries, 1993; Haas e Plow, 1994). Cada complexo possui pelo menos uma proteína capaz de se ligar aos receptores da célula alvo. Uma possibilidade para a existência destes complexos seria que um destes funcionaria na movimentação do parasito através das barreiras teciduais, enquanto os outros seriam dedicados à penetração da célula hospedeira, capacitando o reconhecimento pelo parasito de uma variedade maior de receptores, amplificando assim sua gama de hospedeiros (Carruthers, 2002). O fato do *T. gondii* invadir diferentes tipos celulares sugere a existência de um receptor específico universalmente distribuído, ou então, a participação de vários receptores diferentes. Por exemplo, tem sido demonstrado que a laminina, uma importante proteína encontrada nas membranas basais, aumenta a adesão dos taquizoítos à célula hospedeira e que estes podem reconhecer e se ligar a múltiplos receptores da laminina como a  $\alpha\beta 1$  integrina (Furtado e cols., 1992). De um modo geral, o reconhecimento de múltiplos glicosaminoglicanos sulfatados na superfície da célula hospedeira contribui para a adesão e invasão deste parasito em diferentes tecidos (Carruthers e cols., 2000). A SAG1 (p30) principal proteína de superfície de taquizoítos com 30KDa, é reconhecida por receptores glicosilados da célula hospedeira (Bonhomme e cols., 1999).

Alexander e cols. (2005) descreveram a secreção coordenada das róptrias e micronemas identificando um complexo de quatro proteínas: TgAMA1, RON2, RON4 e a Ts4705. Pelo menos duas destas proteínas, a TgAMA1 e a RON4 interagem no processo de entrada, localizando-se em uma constrição denominada junção móvel (JM), onde as membranas do parasito e do hospedeiro ficam em íntimo contato (Alexander e cols., 2005). A JM serve para excluir proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira, dando início à formação da membrana do vacúolo

parasitóforo (MVP) (Mordue e cols., 1999). Outras proteínas das róptrias são inseridas na MVP, contribuindo para sua formação durante a invasão da célula hospedeira pelo *Toxoplasma* (Boothroyd e Dubremetz, 2008).

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

Vários estudos sugerem que as proteínas dos grânulos densos participem na modificação do VP, de sua membrana e da sua interação com o citosol da célula hospedeira. Secretadas logo após os parasitos serem encontrados no interior do VP (Brossier e Sibley, 2005), as proteínas dos grânulos densos estão diretamente envolvidas no amadurecimento deste vacúolo (Cesbron-Delauw cols., 2008). No espaço intravacuolar, por exemplo, é formada uma rede de nanotúbulos que pode estar funcionando como uma via de intercâmbio de moléculas entre o citoplasma da célula hospedeira e parasito (Sibley e cols., 1995). As proteínas GRA2, GRA3 e GRA6 possuem um papel fundamental na formação dos nanotúbulos, sendo a GRA2 e GRA4 envolvidas na organização de vesículas que após alongamento darão origem à rede intravacuolar madura, e a GRA6 na estabilização da membrana tubular desta rede (Mercier e cols., 2002, 2005). A GRA7 encontrada na MVP está sendo relacionada com a formação de “condutos tubulares”. Esses túbulos, derivados da invaginação da MVP, estariam atuando na entrega de lipídios, através do espaço vacuolar para o parasito (Coppens e cols., 2006).

Sendo assim, a formação e desenvolvimento do vacúolo parasitóforo (VP), bem como a modificação de sua membrana, envolvem moléculas de ambas as células (parasito e célula hospedeira) atuando na proteção do *T. gondii* contra a ação de radicais livres, variações de pH, osmolaridade e evitando também, os mecanismos de defesa do hospedeiro (Pacheco-Soares e De Souza, 1998; Laliberté & Carruthers 2008; Sinai, 2008). Outra vantagem é que este vacúolo, diferentemente dos fagossomos não se funde com compartimentos da via endocítica (Joiner e cols., 1990; Mordue e cols., 1999; Sinai, 2008).

## 5. Tecido muscular

### 5.1. Origem e fatores envolvidos na miogenese e regeneração

No desenvolvimento embrionário dos vertebrados são formadas 3 lâminas circulares, das quais derivam os tecidos e órgãos. O ectoderma (lâmina externa) formará a epiderme, tecido nervoso e alguns tecidos conjuntivos e esqueléticos da cabeça. A lâmina mais profunda é o endoderma que dará lugar ao revestimento interno dos aparelhos digestivo e respiratório. Entre ambas as lâminas se dispõem o mesoderma, formado por células que serão as precursoras de formação da maior parte dos tecidos musculares esqueléticos, parte do sistema urogenital, coração e vasos sanguíneos (Noden e Francis-West, 2006).

As células precursoras musculares são derivadas do dermiótomo (DM) a partir dos somitos, os quais se originam do mesoderma, em resposta a sinais moleculares de tecidos vizinhos pela secreção de fatores Shh e Wnt, pela notocorda e tubo neural, respectivamente (Pownall e cols., 2002; Pourquié, 2003). A secreção dos fatores Shh e Wnt induz a expressão de fatores reguladores miogênicos (MRFs), um grupo de fatores transcricionais básicos hélice-alça-hélice (bHLH), que são críticos para a determinação e diferenciação terminal do músculo esquelético. Assim, nos somitos algumas células tornam-se pré-determinadas a se diferenciar em mioblastos e migram para tecido conjuntivo adjacentes. Porém, o determinante para ser mioblasto depende da ativação de um ou mais genes miogênicos, que codificam proteínas regulatórias da família hélice-volta hélice (Pownall e cols., 2002; Pourquié, 2003).

Os MRFs (MyoD, Myf5, miogenina e MRF4) juntos com proteínas da família MEF2 coordenam a expressão de genes durante a miogênese (Pownall e cols., 2002; Berkes e Tapscott, 2005). Estes fatores reguladores juntamente com outros fatores estimuladores (fatores de crescimento), ativam a migração celular e o programa de diferenciação através da indução da transcrição de genes músculo-específicos, tanto regulatórios quanto estruturais (Buckingham, 2003). A expressão de MyoD e Myf5 é uma etapa fundamental e resulta no comprometimento de células do somito em linhagens miogênicas, enquanto a miogenina desempenha importante papel na diferenciação terminal de mioblastos. Na diferenciação terminal, mioblastos saem do ciclo celular e tornam-se aptos à fusão (Berkes e Tapscott, 2005) (Fig. 2).

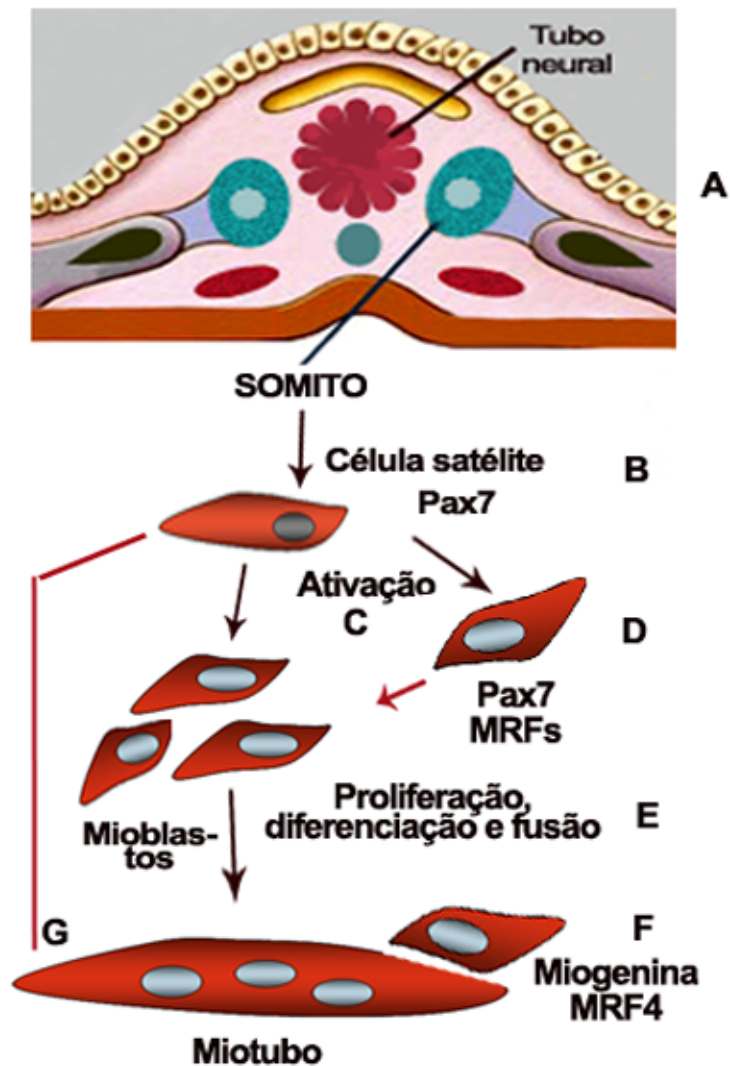
O processo de regeneração do tecido muscular é altamente organizado, envolvendo ativação, proliferação e diferenciação das células satélites (Tajbakhsh,

2009). Estas células representam uma população de células miogênicas que atuam no crescimento pós-natal do músculo esquelético, no reparo de dano e na manutenção de fibras de músculo esquelético adulto (Hawk e cols., 2001). Em resposta a estímulos adaptativos como microtraumas ou estímulos mais severos (distrofia muscular ou ação de toxinas), as células satélites são ativadas, proliferam e se diferenciam em mioblastos (Hawke e Garry, 2001). Durante a regeneração os mioblastos migram para a região danificada e, fundem-se à fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão caracterizando a hipertrofia, porém, em casos mais severos, os mioblastos poderão se alinhar e se fundir entre si, para formar uma nova miofibra (Hawke e Garry, 2001; Chargé e Rudnicki, 2004). As células satélites quiescentes não expressam os MRFs, porém, em consequência de um miotrauma, são ativadas, proliferam, se diferenciam e passam a expressar estes fatores (Seale e Rudnicki, 2000).

Tem sido sugerido que as células satélites tenham origem de células miogênicas genéricas, linhagens específicas de mioblastos, remanescentes embrionários ou mioblastos fetais (Dodson e cols., 1996). As células satélites do tecido muscular expressam vários marcadores moleculares, dentre eles destacamos: c-met (Tatsumi e cols., 1998), VCAM1 (molécula de adesão celular vascular-1) (Jesse e cols., 1998), M-caderin (Irintchev e cols., 1994) e Pax7 (Seale e cols., 2000). Quando ativadas, as células satélites expressam vários fatores transcricionais, dentre eles, os fatores reguladores miogênicos MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Holterman e Rudnicki, 2005), que controlam a proliferação e a diferenciação celular (Fig. 2).

As células satélites residem entre o sarcolema e a lâmina basal de miofibras e compreendem apenas uma pequena porcentagem de todos os músculos nucleados relacionados no nascimento (Hawke e Garry, 2001). Após a puberdade estas células permanecem mitoticamente quiescentes até um estímulo, como por exemplo, exercício ou dano, que induzem a liberação de fatores de crescimento, estimulando as células a reentrarem no ciclo celular (Kokta e cols., 2004).





**Alessandra Ferreira Gomes**

**Figura 02: Origem embrionária do tecido muscular em mamíferos:** (A) O músculo esquelético é derivado de estruturas embrionárias chamadas somitos, que são blocos de células mesodérmicas. (B-G) Representação dos eventos moleculares reguladores da ativação das células satélites (CS) durante a miogênese. (B) As CS que expressam o fator regulatório Pax7, (C) são ativadas e, (D) passam a expressar também os Fatores Reguladores da Miogênese (MRFs) originando os mioblastos. (E) Após proliferação e diferenciação terminal, mioblastos já diferenciados podem: (i) se fundir na miofibrila lesada (reparo tecidual) ou, (ii) a partir da fusão uns com outros ou com miotubos, formar uma nova miofibrila. (F) Mioblastos nesta fase não se dividem mais e expressam altos níveis de miogenina e MRF4. (G) Algumas CS migram e ficam quiescentes sobre a miofibrila até serem novamente ativadas.

A regulação dos fatores transcricionais do músculo e genes específicos envolve interações célula-célula e célula matriz, bem como os fatores secretados pelas células dos tecidos, incluindo: crescimento de hepatócito (HGF), crescimento de fibroblastos (FGF) e crescimento semelhantes à insulina (IGF), crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e citocinas como, por exemplo, a interleucina-6 (IL-6) (Hawke e Garry, 2001; Charge e Rudnicki, 2004; Serrano e cols., 2008).

## **5.2 Citoesqueleto x miofibrilogênese**

O citoesqueleto é uma elaborada rede de proteínas responsável pela estrutura e forma da célula, e por interagir com a membrana celular e induzir a motilidade celular (Venticinque e cols., 2011). Esta rede é altamente dinâmica e sofre variações entre taxas de polimerização e despolimerização de suas proteínas. Atuando como um “atalho”, o citoesqueleto liga os diferentes pontos da célula, utilizando proteínas motoras para o transporte intracelular de vesículas, proteínas, macromoléculas e organelas participando também, da contração muscular e da segregação dos cromossomos nos eventos de mitose (Small e Sobieszek, 1977; Clark e cols., 2002; Costa e cols., 2004; Michie e Lowe 2006; Venticinque e cols., 2011). Principais componentes do citoesqueleto são os microfilamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermediários e proteínas acessórias que também podem formar filamentos, como é o caso da miosina.

Os microtúbulos podem existir independentemente isolados, funcionando como trilhos no citoplasma das células para deslocamento, por exemplo, de vesículas ou organelas, via as proteínas motoras: cinesina e dineína. Também estão envolvidos em inúmeros processos celulares incluindo, transporte intracelular, posicionamento de organelas, motilidade celular e mitoses. São formados por polímeros compostos por heterodímeros de subunidades de alfa e beta tubulina (50-55 kDa cada) que se organizam em protofilamentos associados lateralmente para a formação de microtúbulos (Heald e Nogales, 2002; Kapitein e Hoogenraad, 2010). A polimerização da tubulina ocorre a partir do centro organizador micrutubular (MTOC) ou centrossomo que durante o processo de mitose se duplica, posicionando-se nos pólos opostos da célula. A dinâmica funcional dos microtúbulos é regulada por uma variedade de proteínas correlacionadas denominadas proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs), diferentes para cada espécie e tecido (Clark e cols., 2002; Heald e Nogales, 2002; Lüders e Stearns, 2007; Kapitein e Hoogenraad, 2010).

Os filamentos intermediários (FI) e suas proteínas associadas representam um fator chave na manutenção da integridade estrutural da célula, e na geração da força e estabilidade mecânicas em músculo estriado (Clark e cols., 2002; Costa e cols., 2004). A desmina (52 kDa) é a proteína predominante dos filamentos intermediários do tecido muscular (Lazarides, 1980). Esses filamentos são abundantemente encontrados interconectando a região da linha Z dos sarcômeros, junções miotendinais, discos intercalares e costômeros (via plectina), que ligam a desmina ao sarcolema por proteínas associadas ao complexo distrofina, como a  $\alpha$ -actinina (Hijikata e cols. 2003). Na célula muscular madura, os filamentos de desmina desempenham um papel fundamental na formação do citoesqueleto extrasarcomérico. Esta estrutura filamentosa forma um andaime tridimensional em núcleos, mitocôndrias e sarcolema (Schröder e Schoser, 2009). A desmina apesar de ser uma das primeiras proteínas músculo específica a ser sintetizada, é a última na formação das miofibrilas, conferindo o padrão estriado da fibra (Costa e cols., 2004).

A actina (42 kDa) é altamente conservada em células eucarióticas, podendo ser encontrada sob duas formas: actina G (subunidades globulares) e F-actina (filamentosa). Os microfilamentos são formados por polímeros de actina (proteína mais abundante do citoesqueleto) e estão envolvidos em vários processos celulares dentre eles: morfologia celular, o transporte de íon, vesículas e organelas, motilidade, fagocitose e sinalização (Dos Remédios e cols., 2003). O citoesqueleto de actina é altamente dinâmico, envolvendo polimerização e despolimerização de suas terminações (Wang e cols., 1989). Nos vertebrados os genes que codificam esta proteína geram três isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , classificadas de acordo com seus pontos isoelétricos. No tecido muscular a  $\alpha$ -actina se encontra nas bandas I do sarcômero e atua no processo de contração em associação com outras proteínas como: miosina, tropomiosina e proteínas do complexo troponina (troponina T, C e I), gerando força contrátil em associação com as linhas Z dos sarcômeros nas miofibrilas (Littplefiel e Fowler, 1998; Clark e cols., 2002).

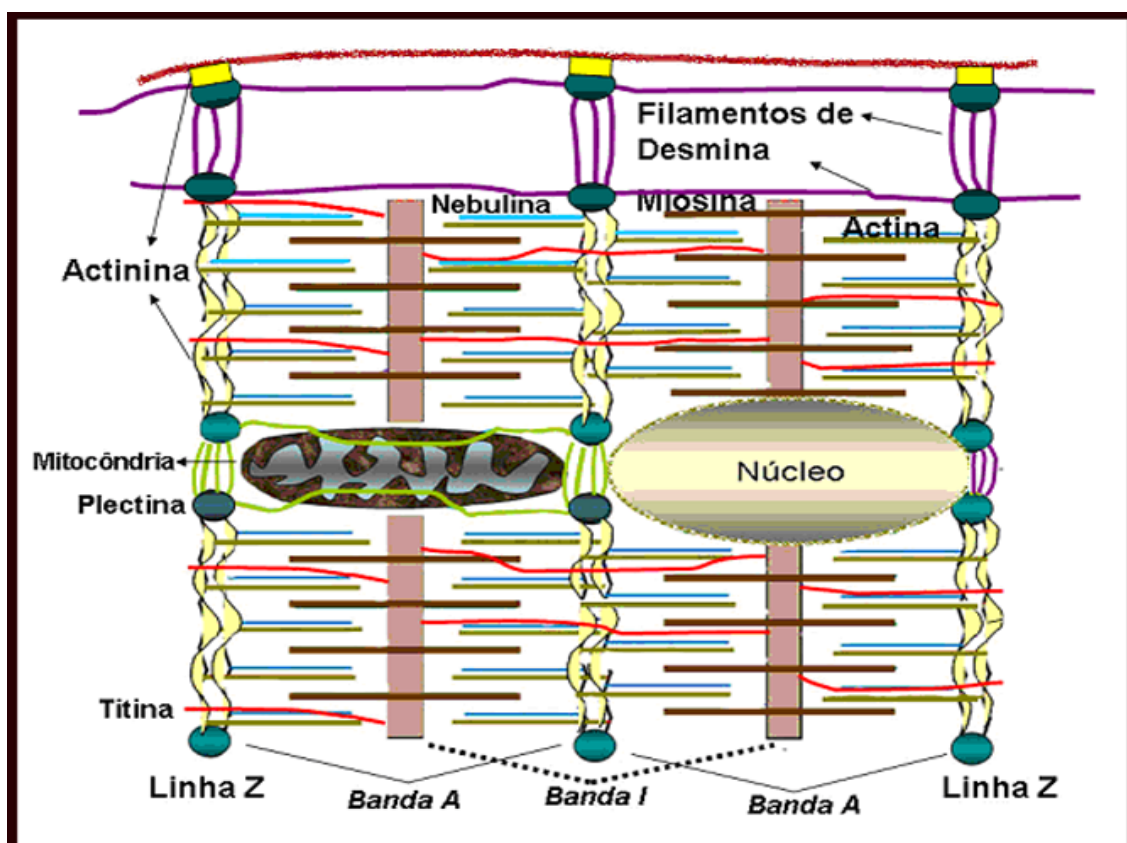
A miosina é uma família de moléculas motoras envolvidas em diferentes processos celulares, como por exemplo, a contração muscular, desempenhando importante papel no movimento intracelular de organelas (Mermall e cols., 1998; Wu e cols., 2000). Em células musculares, a miosina apresenta participação no processo de contração muscular localizada na banda A do sarcômero (Sanger e cols., 2006). A contração é um processo dependente de cálcio e ATP que ocorre à

medida que os filamentos finos de actina deslizam sobre os filamentos grossos de miosina, deformando o sarcômero (Clark e cols., 2002). A miosina II (244 kDa) é uma proteína muito grande e forma os filamentos espessos do músculo esquelético e a miosina I (110 a 130 kDa) é menor, com uma maior distribuição, e não forma filamentos, normalmente está associada à membrana (Clark e cols., 2002).

O citoesqueleto em células musculares esqueléticas (CME) acompanha as alterações decorrentes da miogênese. Durante o processo de formação de miofibrilas, ocorre a reorganização de seus constituintes, como do centro organizador microtubular, passando da região pericentriolar em mioblastos para uma localização ao longo da membrana nuclear, devido à redistribuição da  $\gamma$ -tubulina, realocada na superfície dos núcleos em miotubos e miofibras (Tassin e cols., 1985; Bugnard e cols., 2005).

A organização de miofibrilas em células musculares, processo denominado miofibrillogênese, envolve uma distribuição ordenada de proteínas músculo-específicas para a formação de sarcômeros (Sanger e cols., 2002, 2010).

O modelo organizacional das miofibrilas ocorre em associação com a membrana plasmática em regiões de crescimento do miotubo. Inicialmente, as pré-miofibrilas são compostas por mini-sarcômeros constituídos de corpúsculos Z enriquecidos com  $\alpha$ -actinina, miosina II não muscular e filamentos de actina com suas proteínas associadas. Em seguida, ocorre o aparecimento dos filamentos de titina que atuam delimitando o espaço entre as bandas Z dos sarcômeros. Concomitantemente, a miosina muscular começa a ser expressa e segue aos poucos substituindo a miosina II não muscular, formando as miofibrilas nascentes. Na evolução das miofibrilas nascentes para dar origem a miofibrilas maduras ocorre o alinhamento dos corpúsculos Z (para formação da linha Z). Na seqüência, os filamentos de miosina II se alinham para formação da banda A, onde as proteínas C e a banda M irão organizar o alinhamento final dos filamentos espessos em miofibrilas maduras, formando a estrutura contrátil - os sarcômeros, que conferem a estriação da miofibrila por sucessivas repetições no citoplasma das CME (Spence e cols., 2002; Clark e cols., 2002; Sanger e cols., 2006, 2010) (Fig. 3).



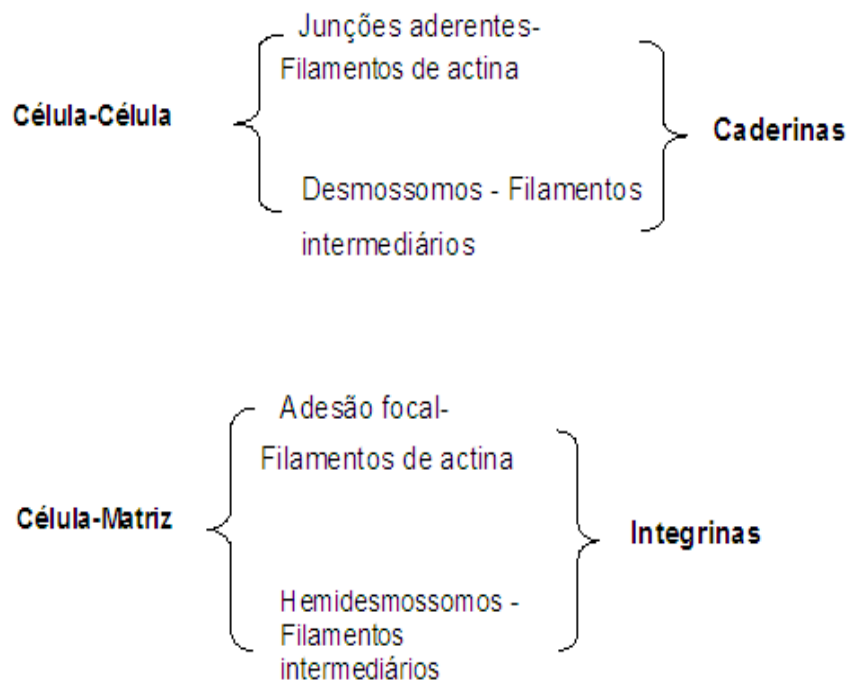
Alessandra Ferreira Gomes

**Fig. 3: Estrutura do sarcômero:** A distribuição dos filamentos de actina e miosina variam ao longo do sarcômero, formando faixas mais claras, as bandas I, contendo apenas actina. Dentro da banda I existe uma linha mais escura denominada disco Z, que corresponde às várias uniões entre dois filamentos de actina e alfa-actinina. A faixa central escura é chamada banda A, formadas por sobreposição dos filamentos de actina e miosina.

## 6. Associações e especializações do citoesqueleto x membrana plasmática

À medida que as células constituem os tecidos, elas passam a fazer parte de um “contexto social” que necessita de um contato estreito entre elas, para troca de substâncias e informações. Além disso, as células também se associam e se comunicam com o meio externo através da matriz extracelular. Estes pontos de contato entre células e célula - matriz extracelular é denominada junções celulares (Gumbiner, 1996; Chen e Gumbiner, 2006; Meng e Takeichi, 2009; Lefort e cols., 2010). Abaixo encontramos esquema representativo das junções celulares com relação ao citoesqueleto (filamentos de actina ou filamentos intermediários) e

proteínas integrais de membrana (caderina ou integrina) envolvidas na adesão célula-célula ou célula-matriz.



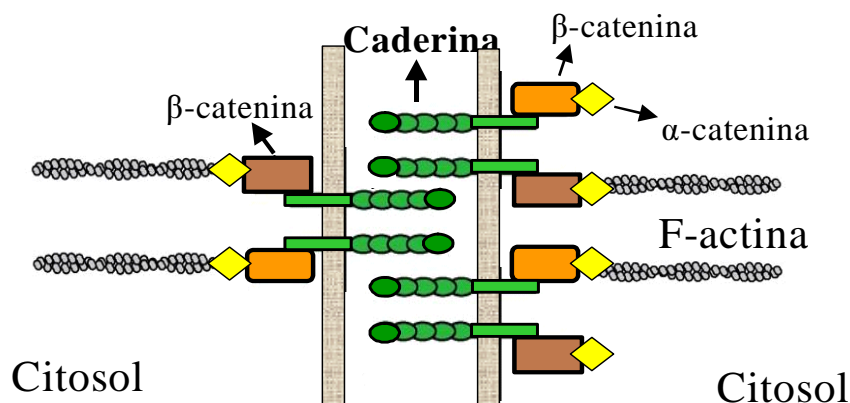
**Alessandra Ferreira Gomes**

### **6.1. Junções Aderentes-Caderinas**

As junções aderentes são especializações que conectam feixes de actina de uma célula à outra mantendo as células unidas. Essas junções são formadas por proteínas de adesão transmembrana da família das caderinas (Chen e Gumbiner, 2006; Meng e Takeichi, 2009; Harris e Tepass, 2010; Lefort e cols., 2011).

As caderinas compreendem uma família de moléculas de adesão cálcio dependentes. Na ausência do  $\text{Ca}^{2+}$ , as caderinas mudam sua conformação e são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas (Nagar e cols., 1996). Os domínios citoplasmáticos das caderinas são altamente conservados no comprimento da molécula, seqüência de aminoácidos e interações com outras moléculas. Esses domínios ocorrem através de um grupo de proteínas de ancoragem intracelular denominado cateninas, gerando ligações-chave das caderinas com o citoesqueleto de actina e microtúbulos (Yap e cols., 1997; Kaufmann e cols., 1999; Meng e Takeichi, 2009). A formação e manutenção de tecido embrionário, fetal e organismos adultos requer a ação de proteínas de adesão (Kaufmann e cols., 1999). Essa interação constitui importantes estruturas na formação e estabilidade das células e tecidos denominada junções aderentes (JAs) (Harris e Tepass, 2010) (Fig. 4). As

JAs são particularmente importantes para a regulação da dinâmica de junções que estão associadas a diversos processos morfogênicos (Gumbiner, 2005). Vários patógenos intracelulares são capazes de modular moléculas de adesão como, caderinas e outras proteínas associadas, durante o processo infeccioso e com isso causar patogênese do tecido, por diminuição das interconexões entre as células (Soler e cols., 2001; Bebb e cols., 2006; Wu e cols., 2008). *Trichomonas vaginalis*, por exemplo, altera a E-caderina e outras duas proteínas associadas em JAs das células epiteliais (Costa e cols., 2005). Já o *T. cruzi*, foi descrito interferir com a N-caderina e vinculina em células musculares cardíacas (Melo e cols., 2008). Nas CME, a interação célula-célula que ocorre durante a miogênese pode ser realizada por moléculas como: imunoglobulinas (V-CAM, N-CAMs) e as caderinas (M e N-caderinas) (Levi, 1993; Jesse e cols., 1998; Charrasse e cols., 2006; Hsiao e Chen, 2010).



**Fig. 4: Junções aderentes-caderina**

**Alessandra Ferreira Gomes**

A M-caderina é encontrada em maior quantidade em mioblastos e células satélites do tecido muscular desempenhando papel-chave no reconhecimento inicial entre mioblastos para formar miotubos multinucleados (Charrasse e cols., 2006; Hsiao e Chen, 2010). Trabalhos apontam para a diminuição da expressão da M e N-caderina durante o processo de miogênese e diferenciação das CME, sendo fortemente expressa em mioblastos e menos em miofibras maduras já fora do programa de divisão celular (Mège e cols., 1992; Irintchev e cols., 1994; Eng e cols., 1997; Kaufmann e cols., 1999; Curci e cols., 2008). No tecido muscular cardíaco as JAs de N-caderina são visualizadas nos sítios de contato entre os miócitos

(mioblastos diferenciados), e colocalizados com a  $\alpha$ -actinina nas linhas Z dos sarcômeros. Este padrão de disposição para a caderina e sua associação com proteínas costaméricas, como vimentina e  $\alpha$ -actininas e linhas Z, atuam conferindo maior estabilidade e força contrátil para as miofibrilas destas células (Yap e cols., 1997; Luo e Radice, 2003; Melo e cols., 2008). Com relação ao processo de reconhecimento e fusão de mioblastos, a N-caderina foi a primeira a ser descrita (Knudsen e cols., 1990), porém não é músculo-específica. A M-caderina, no entanto, é específica durante a embriogênese, sendo restrita aos mioblastos e miotubos (Rose e cols., 1994; Hsiao e Chen, 2010). As CME derivadas dos somitos recebem sinais da notocorda e tubo neural e induzem a especificação dos precursores miogênicos, ou seja, MyoD ou Myf5 e outros marcadores músculo-específico, como a desmina (Buckingham, 2003). Uma vez que essas células expressam MyoD ou Myf5, passam a ser comprometidas com a linhagem miogênica e tornam-se mioblastos. Estes mioblastos se fusionam e se diferenciam em miotubos para originar o músculo esquelético (Black e Olson, 1998). Um estudo utilizando cultura primária de músculo esquelético de rato mostrou que após a inibição da miogênese, a N-caderina não sofre nenhuma variação, enquanto a M-caderina é regulada negativamente, o que a caracteriza como um fator chave neste processo em CME (Eng e cols., 1997). Elucidando essa afirmação, recentemente Hsiao e Chen (2010), descreveram que a maioria dos MRFs ativa o promotor da M-caderina, mas não o da N-caderina. Eles mostraram por testes de imunoprecipitação da cromatina, de que forma a MyoD e miogenina se ligam ao promotor da caderina *in vivo*. Em conjunto, estas observações podem identificar um mecanismo molecular pelo qual os MRFs regulam diretamente a expressão de M-caderina para garantir a diferenciação terminal e fusão dos mioblastos (Hsiao e Chen, 2010).

Após lesão do músculo esquelético, o gene para M-caderina é ativado e os níveis mais elevados são encontrados durante a fusão dos mioblastos-miofibras, o que implica o seu papel na mediação da comunicação e aderência entre estas células (Rose e cols., 1994; Irintchev e cols., 1994). No processo de regeneração do tecido muscular, além da M-caderina, a N-caderina também é induzida (Hollnagel e cols., 2002). Porém, camundongos sem N-caderina apresentam defeitos graves na neurulação, somitogênese e cardiogênese e morrem antes de formar o tecido muscular (Radice e cols., 1997). Mioblastos derivados destes camundongos formaram miotubos *in vitro*, sugerindo redundância entre as caderinas (Charlton e cols., 1997). Embora as M e a N-caderinas terem sido demonstradas desempenhar

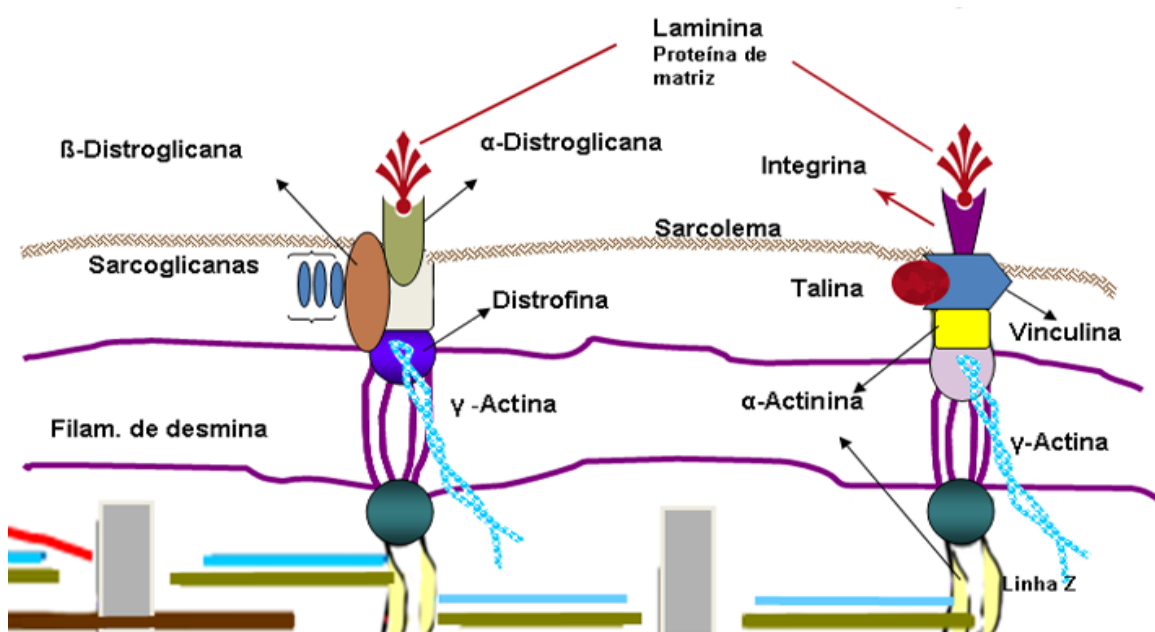


um papel crítico durante a miogênese, os mecanismos que dirigem a expressão de ambas às proteínas durante este processo, permanecem obscuros (Hsiao e Chen, 2010).

## 6.2. Costâmeros

O costâmero é uma estrutura funcional componente de células musculares estriadas, formado por um complexo de proteínas especializadas na ancoragem da célula muscular à matriz extracelular. Os costâmeros integram com o sarcolema e alinham-se às linhas Z dos sarcômeros que compõem as miofibrilas (Clark e cols., 2002). A manutenção da estrutura muscular, através dos costâmeros, mantendo a conexão das miofibrilas da linha-Z ao sarcolema e à matriz extracelular, é vital para a rede de transmissão de força e manutenção da integridade do músculo (Spence e cols., 2002).

As principais proteínas costaméricas  $\alpha$ -actinina e a vinculina tem papel na estabilidade e proteção da fibra (Beggs e cols., 1992; Melo e cols., 2004), assim como, as proteínas do complexo distrofina. A proteína distrofina apresenta localização abaixo do sarcolema formando uma trama associada a um complexo de glicoproteínas constituído pelas proteínas distroglicanas, sarcoglicanas e sintrofinas (Watkins e cols., 2000; Spence e cols., 2002). Desta forma, os costâmeros atuam fisicamente interligando estas linhas Z ao sarcolema da célula muscular conferindo a integridade destas células (Clark e cols., 2002; Spence e cols., 2002), como mostrado no esquema abaixo (Fig. 5).



Alessandra Ferreira Gomes

**Fig. 5: Costâmero:** Esquema da organização de proteínas do complexo sarcoglicanas participando da interação sarcômero e sarcolema e a matriz extracelular, via distroglicanas (proteína transmembrana). Notar total interação destas proteínas com os filamentos de desmina e  $\gamma$ -actina. Ao lado, o ponto de adesão focal destacando a integrina e proteínas de ancoragem, como a  $\alpha$ -actinina. A proteína  $\alpha$ -actinina é o maior componente da linha Z dos sarcômeros, participando da interação dos filamentos intermediários de desmina à membrana plasmática da célula.

## 7. Miopatias musculares

Miopatia miofibrilar (MFM) é uma desordem na célula muscular especialmente relevante para a funcionalidade das miofibrilas que se caracteriza pelo acúmulo anormal de proteínas (Selcen e Engel, 2004). As MFM são clinicamente caracterizadas por um curso progressivo levando à incapacidade grave das células musculares (Goebel e cols., 2008; Schröder e Schoser, 2009).

Estudos mostram que alguns microorganismos parasitos, como vírus, bactérias e protozoários podem causar miopatias, às vezes com sequelas graves (Crum-Cianflone, 2008).

Uma classe recentemente identificada de miopatia é produzida por anormalidades nos filamentos intermediários de desmina (desminopatias). Como já descrito, a desmina é um componente essencial do citoesqueleto extra-sarcomérico (Schröder e Schoser, 2009). Desta forma, camundongos *knockout* têm ajudado a revelar o papel fundamental da desmina no alinhamento de sarcômeros, organização de miofibrilas e distribuição de mitocôndria nas CME. Estudos mostram que a perda da função intermediária da desmina, como resultado de mutações no gene, leva ao acúmulo de agregados de desmina insolúvel, gerando alterações destrutivas na organização dos sarcômeros, importantes para a progressão da doença (Paulin e cols., 2004).

No caso da toxoplasmose, a maioria dos relatos para miopatias envolve pacientes imunocomprometidos, principalmente por causa da reativação dos cistos encontrados no tecido muscular (Gherardi e cols., 1992). Porém, alguns trabalhos mostram a severidade com que a Toxoplasmose pode se manifestar mesmo em indivíduos imunocompetentes. No Brasil, por exemplo, dois irmãos infectados no mesmo período e sob as mesmas condições desenvolveram tetraplegia e o outro

miocardite devido ao toxoplasma (Calore e cols., 2000). Recentemente, no Peru, Nunura e cols. (2010) reportaram um caso de toxoplasmose severa em paciente imunocompetente, caracterizada por pneumonia, retinocorioidite, hepatite e miosites com a presença de cistos no músculo esquelético deste paciente. No presente trabalho, nós iremos investigar o papel da proteína de adesão caderina e do citoesqueleto das CME durante o processo de interação com o Toxoplasma. Através dos nossos resultados pretendemos contribuir para um melhor entendimento das conseqüências estruturais de miopatias desenvolvidas pelo toxoplasma neste tecido.

## **8. Manobras do *T. gondii* e a resposta celular frente à infecção**

### **8.1. Corpúsculos lipídicos**

É conhecida que a residência de *T. gondii* em células hospedeiras envolve uma série de eventos moleculares e estruturais de ambas as células (Alexander e cols., 2005; Carruthers e Blackman, 2005). Além de características singulares, o VP que abriga o *T. gondii*, estabelece interações com organelas da célula hospedeira que podem estar relacionadas com as vias de aquisição de nutrientes pelo parasito (Opitz e cols., 2002; Sibley, 2003; Coppens, 2006; Sinai, 2008). Os principais estudos, no entanto concentram atenção na biogênese do MVP e nos mecanismos de aquisição de lipídios e colesterol pelo parasito dentro do vacúolo (Charron e Sibley, 2002; Coppens e Joiner, 2003; Coppens 2006). Observações ultraestruturais de Charron e Sibley (2002) sugerem que o recrutamento de organelas da célula hospedeira para MVP pode representar uma importante adaptação para aquisição de lipídio pelo Toxoplasma, facilitando o seu crescimento intracelular.

Estudos anteriores propõem que a mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira possam atuar como fornecedores de lipídios, contribuindo assim para o aumento da área da membrana do vacúolo durante o desenvolvimento do parasito (De Melo & De Souza, 1996; Sinai e cols., 1997; Sinai e Joiner, 1997; 2001).

Estruturalmente, os CL consistem de um núcleo de lipídios apolar (ésteres de colesterol e triglicerídeos) envolto por uma monocamada única de fosfolipídios (Tauchi-Sato e cols., 2002; Ozeki e cols., 2005). Além de conter lipídios neutros, triacilgliceróis (TG), proteínas kinases, caveolinas, citocinas, variada composição protéica, ésteres de esterol, enzimas formadoras de eicosanóides e metabólicas de

lipídios (Tauchi-Sato e cols., 2002; Gupta e cols., 2005; Bozza e cols., 2007; Accioly e cols., 2008). A formação de gotículas lipídicas ou CL é amplamente discutida e acredita-se que ocorra pelo acúmulo de lipídios neutros da bicamada da membrana do RE. Os modelos propostos para a biogênese dos CL sugerem a transferência de lipídios e proteínas pelo RE, porém os mecanismos envolvidos continuam a ser estudados (Bozza e cols., 2009). As proteínas estruturais mais importantes presentes na superfície dos corpos lipídicos são as proteínas da família PAT, incluindo a perilipina e a proteína adiposa, relacionada com a diferenciação (adipofilina ou ADRP). A função exata da adipofilina não é conhecida, mas parece regular taxas lipolíticas, além de estar envolvida na diferenciação de adipócitos (Prats e cols., 2006; Listenberger e cols., 2007).

Atualmente os CL não são mais vistos como simples depósitos de armazenamento de lipídios neutros intracelulares, mas como organelas metabolicamente ativas, participando de uma série de outras funções, tais como: (i) homeostase de lipídios; (ii) sinalização celular; (iii) tráfico de vesículas intracelulares; (iv) patogênese de doenças, como a diabetes e obesidade e, (V) controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Umlauf e cols., 2004; Larigauderie e cols., 2004; Mishra e cols., 2004; Bozza e cols., 2009; Zehmer e cols., 2009).

Os CL também são descritos como “estoques” de ácido araquidônico (AA) precursores de eicosanóides, vistos em leucócitos e em diferentes subgrupos, incluindo eosinófilos, neutrófilos e monócitos, que contém enzimas formadoras de eicosanóides, como por exemplo, a ciclooxigenase-2 (COX-2) (Pacheco e cols., 2002; D'Avila e cols., 2006; Bozza e cols., 2009). Estudos mostram o acúmulo de CL em leucócitos no âmbito de condições inflamatórias como, por exemplo: sepse bacteriana, inflamação pulmonar alérgica, artrite e em infecções micobacterianas (Bozza e cols., 2009). Para outros patógenos, já é descrito que a conversão enzimática de AA livre pela enzima COX-2 em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), estabelece uma modulação na resposta celular, aumentando a carga parasitária (Rangel e cols., 2002; Bozza e cols., 2009). Também que o acúmulo e/ou disfunção dos CL está envolvido na patogênese de várias doenças no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético (Lewis e Tracy, 2002; Bays e cols., 2004; Frayn e cols., 2006). Portanto, uma questão importante para o entendimento do sucesso da infecção do *T. gondii* no tecido muscular pode ser a regulação da produção de CL e mediadores inflamatórios, tais como a PGE<sub>2</sub>.

## 8.2. Síntese de interleucina-12 e Interferon- $\gamma$ pela célula muscular

Nos últimos anos o tecido muscular vem sendo descrito como um “órgão imunogênico” sintetizando citocinas, como a interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-15. A IL-6 foi a primeira a ser descrita e atualmente está sendo relacionada com o aumento da síntese de cortisol, durante intensa atividade muscular. Além de estar envolvida com a captação de glicose, estimulando a insulina, e a translocação da GLUT-4, a IL-6 também se mostra essencial na regulação das células satélites durante o processo de reparo do tecido muscular (Steensberg e cols., 2003; Pedersen e Febbraio 2007; Serrano e cols., 2008, Nielsen e Pedersen, 2008).

Cheng e cols. (2008) descreveram que a expressão do IFN- $\gamma$  é regulada no músculo esquelético após lesão, e que esta citocina é também necessária para uma eficiente regeneração muscular. Uma das propostas da presente tese é investigar se as citocinas derivadas do músculo, as "miocinas" descritas por Pedersen e cols. (2007) e Nielsen e Pedersen (2008) podem desempenhar algum papel na regulação do curso da infecção pelo *T. gondii* durante seu estágio-conversão

Em geral, com o avanço da infecção, tem sido proposto que a partir da resposta imunológica do hospedeiro, agindo sobre a multiplicação dos taquizoítos, há indução da conversão para bradizoítos, com a formação de cistos quiescentes no interior dos tecidos do sistema nervoso central e tecido muscular (Dubey e cols., 1998; Dubey, 2004). Estudos mostram que a infecção aguda em ratos provocada pelo *T. gondii* induz uma resposta inata inicial, seguida por uma resposta antígeno-específica adquirida, que é particularmente crítica para controle da infecção (Yap e Sher, 1999). Essa resposta imune específica é desenvolvida pelos linfócitos T originados do timo, que podem promover a destruição de parasitos intracelulares e também a lise de células infectadas (Haynes e Heinly, 1995). Direta e indiretamente, estas ações são exercidas através da secreção de citocinas. Estudos mostram que o *T. gondii* pode diretamente desencadear a liberação de IL-12 em células dendríticas, macrófagos e neutrófilos *in vitro*, e que a IL-12 por sua vez, pode promover a produção de IFN- $\gamma$  agindo através de STAT4 destas células (Denkers, 2003). A imunidade do hospedeiro especificamente contra o *Toxoplasma* é dependente do IFN- $\gamma$ , por diminuir a multiplicação dos taquizoítos podendo (dependendo do tipo celular) promover a conversão para bradizoítos, e também por suprimir a reativação da infecção crônica (Bohne e cols., 1993; Carruthers e Suzuki 2007; Lalibert e Carruthers, 2008).

Ambas citocinas: IL-12 e o IFN- $\gamma$  são essenciais para induzir uma resposta inflamatória e o controle da carga parasitária, durante estágios iniciais da infecção (Silva e cols., 2009). Estudos *in vivo* indicam o IFN- $\gamma$  como a principal citocina que medeia a resistência contra a infecção pelo *T. gondii* (Suzuki e cols., 1988). Nesta linha, trabalhos foram realizados usando camundongos com deficiência de síntese do IFN- $\gamma$ . O estudo estabeleceu um animal com retinocoroidite toxoplásmica em ambos hospedeiros, imunocompetentes e imunocomprometidos. Os resultados mostraram uma maior carga parasitária na retina, coróide e nervo óptico dos camundongos com deficiência, sendo as formas taquizoítas observadas nos imunodeficientes e bradizoítas nos imunocompetentes (Norose e cols., 2003). Estes resultados demonstram a importância do IFN- $\gamma$  na modulação da toxoplasmose e sugere que a deficiência na produção de determinadas citocinas pode determinar um aumento das lesões, associado à taxa parasitária. Interessantemente, outros estudos mostram que indivíduos assintomáticos secretaram significativamente mais IL-12 e IFN- $\gamma$  do que os indivíduos com toxoplasmose ocular adquirida. Já os pacientes com toxoplasmose ocular congênita, secretaram significativamente menos IL-12 e IFN- $\gamma$  com relação ao antígeno parasitário do que os pacientes com a doença adquirida.

Estudos anteriores mostraram que na fase inicial da infecção, com a entrada do *T. gondii*, os parasitos e seus antígenos induzem as células dendríticas e macrófagos a produzirem citocinas, tais como, a IL-1, IL-12, e o TNF- $\alpha$  (Gazzinelli e cols., 1994). Ao mesmo tempo, passam a produzir grande quantidade de IFN- $\gamma$  para intensificar a ativação dos macrófagos infectados (Gazzinelli e cols., 1996). Essa ativação estimulada pelo IFN- $\gamma$  aumenta o metabolismo oxidativo do macrófago, com produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) inibindo a replicação e causando a destruição dos taquizoítos fagocitados (Murray e cols., 1985). Esta fonte de IFN- $\gamma$  é capaz de conter o parasito durante a fase inicial da infecção aguda e ajudar a limitar a disseminação da infecção para outros tecidos. Experimentos *in vitro* têm mostrado um papel crucial tanto para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na indução de intermediários reativos do nitrogênio (IRN), e atividade microbicida exibido por macrófagos murinos contra taquizoítos (Adams e cols., 1990; Sibley e cols., 1991; Langermans e cols., 1992). Outros experimentos com inibidores de iNOS ou camundongos iNOS-/- demonstraram que a produção de IRN é importante para controlar a infecção crônica, uma vez que estes animais desenvolvem encefalite necrosante em 3 a 4 semanas pós-infecção (Hayashi e cols., 1996; Scharon-kersten e cols., 1997; Silva

e cols., 2002). Recentemente, Ibrahim e cols. (2009), observaram que o tratamento de macrófagos com a molécula TgCyp18 (isoladas do *T. gondii*), levou a uma diminuição da multiplicação do parasito, além de aumentar o estágio conversão para as formas bradizoítas pelo NO em uma via dependente do receptor CCR5.

É importante lembrar que na fase inicial da infecção o IFN- $\gamma$  é conhecido por induzir uma resposta inflamatória com o controle da carga parasitária (Silva e cols., 2009). No caso do Toxoplasma a imunidade é dependente de IFN- $\gamma$  induzida pela produção de IL-12 por uma variedade de tipos de células (Denkers, 2003). Nesta linha, é interessante para o Toxoplasma uma resposta imune protetora do hospedeiro até que ocorra a transmissão, através da contaminação oral de cistos teciduais. Experimentos em ratos que não expressam a IL-12 e o IFN- $\gamma$ , mostraram ausência de imunidade adequada conduzindo rapidamente à morte do hospedeiro (Gazzinelli e cols., 1994; Scharon-Kersten e cols., 1996).

Desta forma a abordagem do tecido muscular como um órgão produtor de citocinas e a conversão espontânea de taquizoítos para bradizoíto, (observada espontaneamente neste tecido frente à infecção pelo *T. gondii*) (Ferreira-da-Silva e cols., 2008; 2009b), abre novas perspectivas para o estudo da toxoplasmose, num modelo celular responsável por um das vias de transmissão do parasito, através da ingestão de carne contendo cistos teciduais (Lopes e cols., 2007; Dubey, 2004; Tenter, 2009).

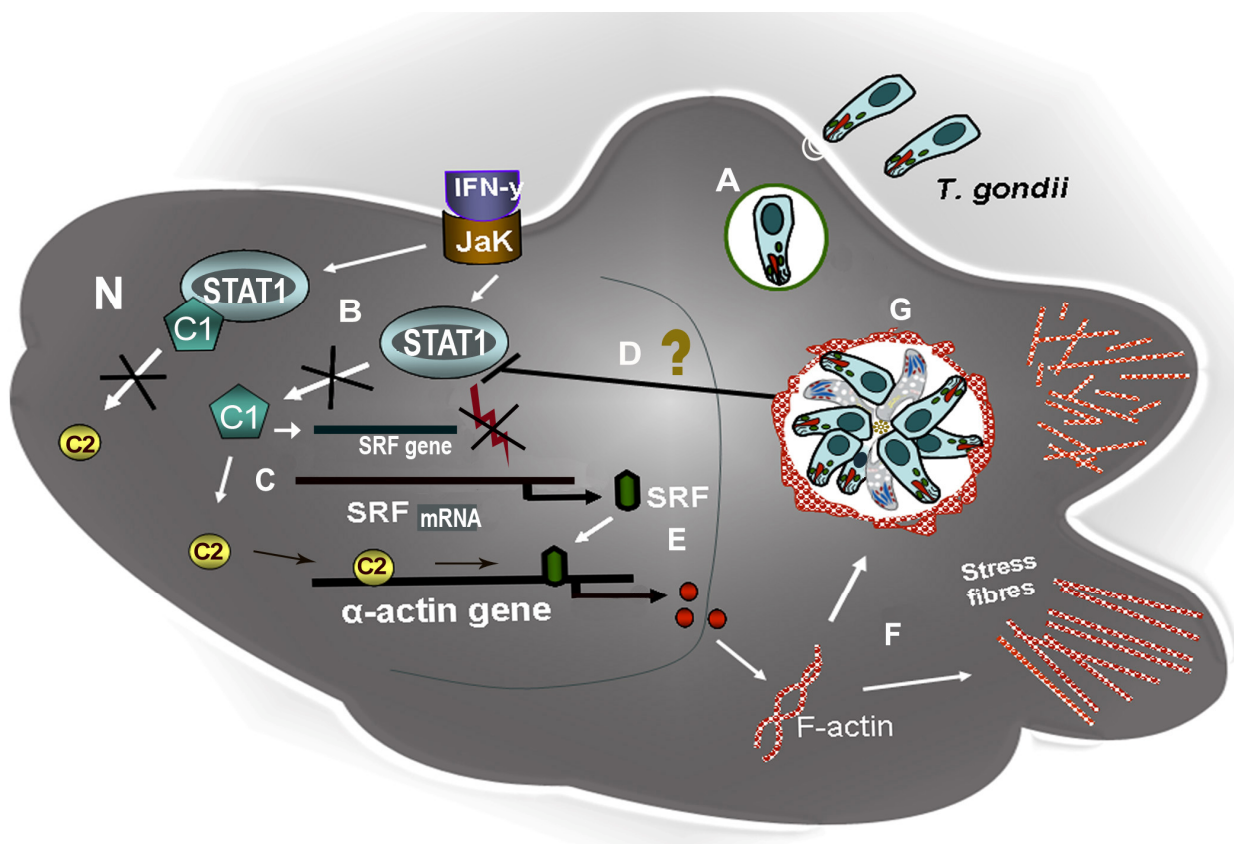
### **8.3. Via de sinalização do interferon- $\gamma$**

Recentemente foi descrito que o *T. gondii* manipula vias de sinalização do hospedeiro e altera a transcrição de genes, através das proteínas das róprias. Um exemplo é ROP16 do parasito que manipula os fatores de transcrição STAT3 e STAT6 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 e 6) no início da infecção. As proteínas das róprias podem alterar a transcrição de genes do hospedeiro para criar um ambiente que favoreça a sua replicação e sobrevivência, aumentando assim a sua patogenicidade (Saeij e cols., 2007; Sibley e cols., 2009). Além do STAT3 e STAT6, é descrito que o *T. gondii* também interfere com STAT1 da célula hospedeira, em uma via diretamente ligada à regulação do IFN- $\gamma$  (Kim e cols., 2007; Lalibert e Carruthers, 2008).

Após a ligação do IFN- $\gamma$  ao seu receptor na membrana da célula, este se associa rapidamente a tirosina-Janus cinases (JAK). Em seguida, esta enzima se liga ao fator de transcrição o STAT1. Após a fosforilação, o STAT1 se transloca para

o núcleo e atua diretamente na transcrição de genes como, por exemplo, o fator regulador de interferon 1 (IRF1), que regula a maior parte dos genes relacionados ao IFN- $\gamma$  (Darnell e cols., 1994; Kim e cols., 2007; Lalibert e Carruthers, 2008).

Com relação à participação do IFN- $\gamma$  sobre o citoesqueleto de actina, Shi e Rockey (2010) demonstraram que o IFN- $\gamma$  pode regular muitos genes, incluindo o fator de resposta do soro (SRF). O SRF é um fator de transcrição importante em processos comuns de proliferação celular, migração e diferenciação das células musculares, e é alvo do IFN- $\gamma$  em uma via STAT1-dependente. Nas células musculares o SRF pode regular muitos genes músculo-específicos, incluindo a  $\alpha$ -actina (Miano e cols., 2007). Em miofibroblastos, a  $\alpha$ -actina de músculo liso também é regulada pelo SRF. Experimentos onde o STAT1 foi inativado mostraram que o IFN- $\gamma$  não foi capaz de afetar a síntese do SRF, também demonstraram que o STAT1 está diretamente envolvido na degradação do mRNA do SRF, além de se ligar a cofatores envolvidos na ativação do gene para a  $\alpha$ -actina juntamente com o SRF (Shi e Rockey, 2010) (Fig. 6).



Alessandra Ferreira Gomes



**Figura 6: Esquema representativo da possível influência do *T. gondii* na via JAK/STAT síntese de actina:** (A) Invasão do *T. gondii* por penetração ativa e formação do vacúolo parasitóforo (B) Ao se ligar ao seu receptor o IFN- $\gamma$  pode ativar a via JAK/STAT e regular a síntese do SRF. Após fosforilação, do STAT1 o mesmo é translocado para o núcleo (N) da célula hospedeira onde pode se ligar a cofatores envolvidos na síntese do SRF e também da  $\alpha$ -actin. (C) Se o STAT1 não se ligar ao cofator C1 este passa atuar no gene SRF e sobre outros cofatores como o C2. (D) O STAT1 ativado pode atuar na degradação do mRNA SRF, porém quando neutralizado pelo *T. gondii* por exemplo, o SRF passa ser sintetizado normalmente. (E) Para que ocorra a síntese de genes músculo específico como a  $\alpha$ -actina, o SRF precisa se ligar ao promotor destes genes juntamente com cofatores envolvidos. (F) Após a síntese e polimerização a  $\alpha$ -actin pode formar fibras de stress. (G) Possível degradação e/ou desorganização dos filamentos de actina e acúmulo na célula hospedeira. Na célula muscular após 24h de interação o *T. gondii* pode iniciar a conversão espontânea de taquízoítos-bradizoítos. Dados compilados dos artigos de Carruthers e Sibley (1997); Sotiropoulos e cols. (1999); Miano e cols. (2007); (Kim e cols. (2007); Lalibert e Carruthers (2008); Ferreira-da-Silva e cols. (2008, 2009a,b) e Shi e Rockey (2010).

A habilidade do *T. gondii* em manipular as respostas do hospedeiro e estabelecer a infecção continua intrigando os cientistas (Lambert e Barragan, 2010). Neste contexto, a presente tese irá abordar a interação do *T. gondii* e células musculares esqueléticas com enfoque: nos aspectos da interferência do parasito na miogênese e a modulação de proteínas de adesão durante esse processo; na avaliação estrutural e molecular de proteínas do citoesqueleto durante essa interação; na influência do parasito no recrutamento e síntese de corpúsculos lipídicos; no papel de citocinas no desenvolvimento intracelular do parasito e ainda, a influência da infecção no desenvolvimento embrionário em camundongos com ênfase na miogênese.

## OBJETIVOS

### I - Objetivo Geral 1:

Estudar a interação *Toxoplasma gondii* - célula muscular esquelética *in vitro* explorando os aspectos estruturais e moleculares da miogênese para estudo comparativo *in vivo* (Artigos 1, 2 e anexo I).

#### Objetivos específicos

1. Estudar a influência da infecção pelo *T. gondii* na miogênese *in vitro* do tecido muscular esquelético de embriões de camundongos, e a participação das moléculas de adesão intercelular, as caderinas neste processo. (Artigo 1)
2. Avaliar a citoarquitetura estrutural e a expressão de algumas proteínas do citoesqueleto de células musculares esqueléticas durante sua interação com *T. gondii*. (Artigo 2)
3. Analisar comparativamente a participação da caderina e do citoesqueleto obtidos *in vitro*, com as alterações morfológicas das células musculares de embriões de camundongos suíços com toxoplasmose congênita. (Anexo I)

### II. Objetivo Geral 2:

Investigar o papel da célula muscular esquelética no desenvolvimento da fase crônica da toxoplasmose analisando: a síntese de corpúsculos lipídicos e indicadores inflamatórios que possam contribuir para a permanência intracelular do parasito (Artigo 3 e anexo II).

#### Objetivos específicos

1. Estudar a participação dos corpúsculos lipídicos na síntese de indicadores inflamatórios, como a ciclooxigenase-2 e prostaglandinas-E<sub>2</sub>, durante a interação de células musculares esqueléticas e *T. gondii* (Artigo 3).
2. Analisar a resposta celular e o papel das citocinas: interferon- $\gamma$  e interleucina-12 durante interação *T. gondii*-célula muscular esquelética (Anexo II).

**ARTIGO I - BMC-Microbiology**

----- Forwarded message -----

From: BioMed Central Accounts <[payment@biomedcentral.com](mailto:payment@biomedcentral.com)>

Date: 2011/4/17

Subject: Article processing charge for manuscript submitted to BMC Microbiology - update

To: [helene@ioc.fiocruz.br](mailto:helene@ioc.fiocruz.br)

MS: 1494086458504937

Research article

***Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis**

Alessandra Ferreira Gomes, Erick Vaz Guimarães, Laís Carvalho, José R. Correa, Leila Mendonça-Lima and

Helene Santos Barbosa

BMC Microbiology

Dear Dr Barbosa

Further to my colleagues email regarding the acceptance of your article, I would like to update you on the status of the article processing charge.

You have agreed to pay an article processing charge of GBP 1,175/USD 1,820/EUR 1,365 on acceptance of your manuscript. Since you are based in Brazil, you will be charged the price of GBP 1,175. Submissions from EU countries are subject to VAT at 20.0%.

Payment can be made through our online credit card

system: <http://www.biomedcentral.com/author/manuscript/payment/creditcardpayment/1494086458504937>

Alternatively, you may request an

invoice: <http://www.biomedcentral.com/author/manuscript/payment/invoicepayment/1494086458504937>

Invoice payments are subject to an administrative charge of £50.00. The article processing charge must be paid before the manuscript will be published.

Kind regards,

BioMed Central Accounts Team

236 Gray's Inn Road

London

WC1X 8HL

Tel: +44 (0) 20 3192 2009

e-mail: [payment@biomedcentral.com](mailto:payment@biomedcentral.com)

1 **RUNNING TITLE: *T. GONDII* AND MYOGENESIS IN SKELETAL MUSCLE CELLS**

2

3

4 ***Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells**  
5 **inhibiting myogenesis**

6

7 Alessandra Ferreira Gomes<sup>a</sup>, Erick Vaz Guimarães<sup>a</sup>, Laís de Carvalho<sup>b</sup>, José R. Correa<sup>a</sup>,  
8 Leila Mendonça-Lima<sup>c</sup> and Helene Santos Barbosa<sup>\*a</sup>

9

10 <sup>a</sup>Lab. de Biologia Estrutural and <sup>c</sup>Lab. de Genômica Funcional e Bioinformática, Instituto  
11 Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-361, Rio de Janeiro, RJ,  
12 Brazil and <sup>b</sup>Lab. Cultura de Células, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio  
13 de Janeiro, RJ, Brazil

14

15 \* To whom correspondence should be addressed: Helene Santos Barbosa - Lab. de  
16 Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365,  
17 21040-361, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

18 Tel: +55-21-+25984316; Fax: +55-21-2260-4434

19 *E-mail:* [helene@ioc.fiocruz.br](mailto:helene@ioc.fiocruz.br)

20

21 Key words: *Toxoplasma gondii*; myogenesis; cadherin; skeletal muscle cells; *T. gondii*-  
22 host cell interaction

23

24 **Abstract**

25 **Background:** *Toxoplasma gondii* belongs to a large and diverse group of obligate  
26 intracellular parasitic protozoa. Primary culture of mice skeletal muscle cells (SkMC) was  
27 employed as a model for experimental toxoplasmosis studies. The myogenesis of SkMC  
28 was reproduced *in vitro* and the ability of *T. gondii* tachyzoite forms to infect myoblasts  
29 and myotubes and its influence on SkMC myogenesis were analyzed.

30 **Results:** In this study we show that, after 24 h of interaction, myoblasts (61%) were  
31 more infected with *T. gondii* than myotubes (38%) and inhibition of myogenesis was  
32 about 75%. The role of adhesion molecules such as cadherin in this event was  
33 investigated. First, we demonstrate that cadherin localization was restricted to the  
34 contact areas between myocytes/myocytes and myocytes/myotubes during the  
35 myogenesis process. Immunofluorescence and immunoblotting analysis of parasite-host  
36 cell interaction showed a 54% reduction in cadherin expression at 24 h of infection.  
37 Concomitantly, a reduction in M-cadherin mRNA levels was observed after 3 and 24 h of  
38 *T. gondii*-host cell interaction.

39 **Conclusions:** These data suggest that *T. gondii* is able to down regulate M-  
40 cadherin expression, leading to molecular modifications in the host cell surface that  
41 interfere with membrane fusion and consequently affect the myogenesis process.

42

43

44

45

46

47

48

## 49 **Background**

50 *Toxoplasma gondii* is an obligatory intracellular parasite and an important human  
51 pathogen. Humans acquire toxoplasmosis due to oocyst seeding from cats, consumption  
52 of raw or undercooked meat or vertical transmission to the fetus during pregnancy.  
53 Studies of environmental factors in several communities indicated an important role for  
54 cultural and eating habits on this infection transmission [1]. During natural vertical  
55 infections, *Toxoplasma* initially crosses the intestinal epithelium of the mother,  
56 disseminates into the deep tissues and traverses the placenta, the blood–brain and the  
57 blood–retina barriers [2]. In both immunocompromised and immunocompetent individuals,  
58 *Toxoplasma* infection can cause a severe ocular pathology [3, 4]. These parasites are  
59 able to invade and rapidly replicate in any nucleated host cell and may develop cysts,  
60 predominantly in neural and muscular tissues, initiating the chronic infection stage.

61 Until now little attention has been given to skeletal muscle as a model in  
62 experimental toxoplasmosis studies [5, 6, 7, 8, 9], though skeletal muscle is one of the  
63 main sites for the occurrence of cystogenesis [10].

64 It is established that toxoplasmosis can cause myositis either by recent infection or  
65 by infection reactivation, causing muscle injury and release of parasites in the  
66 bloodstream [11, 12]. The involvement of muscular tissue in the chronic stage of  
67 toxoplasmosis is a significant clinical aspect for immunodeficient individuals infected with  
68 the HIV virus, and can be employed in biopsies for diagnosis, as proposed by [13]. In  
69 addition, one case of polymyositis in an immunocompetent patient diagnosed with  
70 acquired toxoplasmosis has been reported [14]. The interaction of *T. gondii* and primary  
71 cultures of skeletal muscle cells has been exploited by our group. This model reproduces  
72 important characteristics of the *in vivo* infection and also allows *in vitro* cystogenesis

73 analysis [5-9, 15-17]. The dynamics of SkMC cultures obtained from mouse embryos  
74 allows the investigation of each myogenesis stage [18, 19].

75 The adhesive contact regulation between cells underlies many morphogenetic  
76 processes during the development of new tissues and the controlled growth and turnover  
77 of adult tissues. The cell-cell physical interaction that occurs during myogenesis is  
78 carried out by cellular adhesion molecules. However, cadherins, comprising a family of  
79 adhesion molecules, are particularly important to the dynamic regulation of adherent  
80 junctions, which are associated with diverse morphogenetic processes [20]. Several  
81 intracellular pathogens able to modulate adhesion molecules on this junction during the  
82 infectious process may cause tissue pathogenesis [21-25]. During the myogenesis  
83 process, M-cadherins (M for muscle) are involved in the initial cell-cell recognition,  
84 allowing initiation of myoblast fusion to form multinucleated myotubes [26, 27], as  
85 demonstrated by the RNA interference method [28].

86 In the present study, we examined: (i) *T. gondii* tachyzoite capacity to infect SkMC  
87 (myoblasts and myotubes); (ii) the influence of *T. gondii* infection on the myogenesis  
88 process; (iii) the parasite's impact on SkMC M-cadherin expression and, (iv) its  
89 correlation with the myogenesis process.

90

## 91 **Materials and Methods**

92 All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the  
93 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), by Fundação Oswaldo Cruz-  
94 Fiocruz Committee of Ethics for the Use of Animals (license CEUA LW 10/10) and by the  
95 Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious  
96 Agents (NACLAR).

97

## 98 **Primary culture of skeletal muscle cells**

99 SkMC cultures were obtained from thigh muscles of 18-day-old mouse embryos.  
100 The tissues were minced and incubated for 7 min with 0.05% trypsin and 0.01% versene  
101 diluted in phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS). After 5-7 dissociation cycles, the  
102 enzymatic digestion was interrupted by addition of 10% fetal bovine serum at 4°C. The  
103 suspension was centrifuged at 650g for 7 min, resuspended in Dulbecco's modified Eagle  
104 medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 2% chick  
105 embryo extract, 1 mM L-glutamine, 1,000 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and  
106 then incubated for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, the culture  
107 flask was gently shaken to release non-attached cells and the supernatant enriched with  
108 myoblasts was seeded in 0.02% gelatin-treated 24-well culture plates for the fluorescence  
109 assays. The cultures were maintained at 37°C up to 2-5 days to obtain the muscle fibers  
110 and fresh culture medium was added every two days.

## 111 **Parasites**

112 Tachyzoites of *T. gondii*, RH strain, were maintained in Swiss mice by serial  
113 intraperitoneal inoculation of 10<sup>5</sup> parasites. After 48-72 h the parasites were harvested in  
114 PBS and centrifuged (200g for 7-10 min) at room temperature in order to discard blood  
115 cells and cellular debris. The supernatant was collected and then centrifuged again at  
116 1000g for 10 min. The final pellet was resuspended in DMEM and used in the interaction  
117 assays.

118

## 119 ***T. gondii* infection during skeletal muscle cell myogenesis**

120 Aiming to verify the infectivity of *T. gondii* in myoblasts and myotubes, we developed  
121 the following protocol: 2-day-old cultures were infected with tachyzoite forms (1:1  
122 parasite-host cell ratio) and, after 24 h of interaction, the total number of infected



123 myoblasts and myotubes was quantified independent of the number of internalized  
124 parasites.

125 For evaluation of the potential interference of *T. gondii* in myotube formation, after  
126 the initial seeding, cultures were maintained for 48 h in medium without calcium, in order  
127 to not stimulate myoblast fusion. After this time, the cultures, enriched in myoblasts, were  
128 infected for 24 h. Cell fusion in the presence or absence of *T. gondii* was determined by  
129 morphological analysis of myoblast alignment and the observation of the percentage of  
130 multinucleated cells.

131 The quantitative analysis was based on 3 independent experiments performed in  
132 duplicate with at least 200 cells in each coverslip.

133

#### 134 **Fluorescence analysis of actin microfilaments**

135 SkMC 2-day-old cultures were allowed to interact with tachyzoites (1:1 parasite:  
136 host cell ratio) for 24 and 48 h at 37°C. Non-infected and infected SkMC were fixed for 5  
137 min at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS. After fixation,  
138 the cultures were washed 3 times (10 min each) in the same buffer. Then, the cultures  
139 were incubated for 1h at 37°C with 4 µg/ml phalloidin-rhodamine diluted in PBS.  
140 Thereafter, the cultures were washed 3 times (10 min each) in PBS, incubated for 5 min  
141 with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemical Co.) diluted 1:1000 in PBS  
142 and washed again in PBS. The coverslips were mounted on slides with a solution of  
143 2.5% DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane-triethylenediamine antifading, Sigma  
144 Chemical Co.) in PBS containing 50% glycerol, pH 7.2. The samples were examined in a  
145 confocal laser scanning microscope (CLSM Axiovert 510, META, Zeiss, Germany) from  
146 the Confocal Microscopy Platform/PDTIS/Fiocruz, using a 543 helium laser (LP560  
147 filter) and 405 Diiod laser (LP 420 filter).

148 **Immunofluorescence analysis of total cadherin protein distribution in SkMC**  
149 **myogenesis during infection with *T. gondii***

150 Immunofluorescence assays were performed using specific monoclonal antibodies  
151 for pan-cadherin (Sigma Chemical Co. C3678). Briefly, tachyzoite forms were allowed to  
152 interact with 2-day-old SkMC in the ratio of 1:1. After 3, 12, and 24 h of interaction, the  
153 cultures were fixed for 5 min at room temperature in 4% paraformaldehyde diluted in  
154 PBS and then washed 3 times (10 min each) with PBS. The cultures were incubated for  
155 1h at room temperature in blocking solution containing 4% bovine serum albumin (BSA)  
156 and 0.5% Triton X100 (Sigma Chemical Co.) in PBS, followed by incubation overnight at  
157 37°C with anti-pan cadherin antibody diluted 1:200 in PBS/BSA. The cultures were  
158 washed 3 times (10 min each) in PBS/BSA and incubated for 1h at 37°C with Alexa Fluor  
159 488, goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Molecular Probes) diluted 1:1000 in PBS/BSA.  
160 Coverslips were subsequently washed 3 times (10 min each) in PBS, incubated for 10  
161 min in 0.1 µg/mL DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; Sigma Chemical Co.), a DNA  
162 stain that enables the visualization of host and parasite nuclei, and washed again in  
163 PBS. Coverslips were mounted on slides and examined by confocal microscopy as  
164 described above. Controls were performed by omission of the primary antibody.

165

166 **Western blot analysis**

167 For western blot analysis of total cadherin pool, the proteins were extracted from the  
168 following samples: (a) 2-day-old SkMC to observe the protein synthesis pattern before  
169 infection; (b) 3-day-old SkMC (uninfected control) and, (c) SkMC infected with *T. gondii*  
170 tachyzoites (1:1 parasite:host-cell ratio), 24 h after infection (to study the possible impact  
171 of *T. gondii* infection in cadherin expression). Cadherin expression by *T. gondii*  
172 protozoan alone was also verified by western blot assays. Cells were washed with PBS

173 and maintained in ice for protein extraction. Briefly, cells were collected in approximately  
174 600uL of lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl, 100 ug/mL PMSF, 1 mg/mL  
175 pepstatine, 1 mg/mL aprotinine, 10 mg/mL leupeptine in 1% Triton X-100, 0.4 mg/mL  
176 EGTA). Cell debris were removed by centrifugation, proteins in the cleared supernatant  
177 precipitated with cold acetone and resuspended in 8 M ureum/2% CHAPS. Total protein  
178 concentration was determined with the RC-DC kit (BioRad) prior to separation in 10%  
179 SDS-PAGE gels. Proteins were electro-transferred to Hybond C membranes (GE  
180 Healthcare) with a Trans-Blot apparatus (BioRad), visualized by reversible staining with  
181 MemCode (Pierce) and the images captured in a GS-800 scanning densitometer  
182 (BioRad). Primary anti-Pan-cadherin mouse antibody (Sigma Chemical Co. C-1821) was  
183 used in a 1:2,000 dilution and bound antibodies were revealed using a peroxidase-  
184 coupled anti-mouse IgG antibody (Pierce 31430, 1:5,000 dilution). Blots were visualized  
185 with the SuperSignal West Pico chemiluminescence substrate (Pierce, 34080) and  
186 images captured as described above. For quantitative analysis, western blot signals  
187 were normalized against total proteins detected per lane in the corresponding MemCode  
188 stained membrane using the QuantityOne software (BioRad).

189

### 190 **RNA extraction and reverse transcription-PCR (RT-PCR)**

191 Total RNA was extracted from SkMC culture samples harvested at three different  
192 time points during the *T. gondii* infection assay (3 h, 12 h and 24 h). For this purpose,  $10^6$   
193 cells were harvested and washed three times in PBS and the pellet used for RNA  
194 extraction with the RNeasy kit (Qiagen California, CA, USA - 74104) according to the  
195 manufacture's recommendations. Reverse transcription was carried using 2  $\mu$ g of each  
196 RNA sample and the Mix reagents acquired from BioRad (California, USA – 170-8897),  
197 following the manufacture's instructions. For cDNA amplification, gene-specific primers

198 targeted to M-Cadherin [29] and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)  
199 were used. PCR was carried out in a final volume of 10  $\mu$ L, with 1  $\mu$ L target cDNA, 5 pmol  
200 of each primer, 200  $\mu$ M each desoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (Promega,  
201 Wisconsin, USA), 0.8 units TaqDNA polymerase (Cenbiot, Rio Grande do Sul, Brazil) in  
202 a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> as previously  
203 described [30]. PCR analysis considered the gene expression of infected and uninfected  
204 host cells in relation to the internal control, GAPDH, as previously reported [31-35]. The  
205 samples were amplified for 30 cycles (denaturation at 94 °C for 60 sec, annealing at 56 °C  
206 or 54 °C for M-Cadherin and GAPDH, respectively, and extension at 72 °C for 60 sec).  
207 PCR products were visualized on 8% silver stained polyacrylamide gels. Gel images  
208 were acquired (Epson Perfection 4180 Photo, California, USA)

209

## 210 **Statistical analysis**

211 Densitometric analysis was performed using the Image J software (NIH) or  
212 Quantity One (BioRad, for western blot quantification). Student's *t* -test was used to  
213 determine the significance of differences between means in Western blot, RT-PCR and  
214 quantitative assays. A *p* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

215

## 216 **Results**

217

### 218 ***T. gondii* infectivity of SkMC**

219 Only the number of infected myoblasts and myotubes was evaluated, independently  
220 of the number of parasites internalized. The total number of infected cells (harboring at  
221 least one internalized parasite), after 24 h of SkMC - parasite interaction, represented  
222 61% of myoblasts and 38% of myotubes. These data indicate that myotubes were 1.6-fold

223 less infected than myoblasts (Fig. 1A). Figure 1B shows young and mature uninfected  
224 myotubes surrounded by several heavily infected myoblasts after 48 h of interaction.

225

### 226 **Effect of *T. gondii* infection on SkMC myogenesis**

227 We also analysed the influence of *T. gondii* infection on SkMC myogenesis. Even at  
228 low parasite-host cell ratios (1:1), after 24 h of interaction, the infection percentage was  
229  $43\% \pm 0.06$ . In uninfected 3-day-old cultures the myotube percentage was 19.5% of the  
230 number of total cells. In contrast, infected 3-day-old cultures, after 24 h of infection,  
231 showed only 2.5% of multinuclear cells, representing an inhibition of 75% ( $p \leq 0.05$ ) in  
232 myotube formation (Fig. 2A).

233 Figure 2B shows that infected myoblasts kept their alignment capacity. Additionally,  
234 infected cultures, after 48 h, presented unaltered fusion of non-parasitized myoblasts. The  
235 myogenesis course in this case was maintained as demonstrated by myotube existence  
236 (Fig. 1B).

237

### 238 **Detection of cadherin protein in SkMC during infection with *T. gondii* by** 239 **immunofluorescence analysis**

240 Indirect immunofluorescence assays were performed in order to localize cadherin,  
241 an adhesion molecule involved in homophilic recognition during myoblast and myotube  
242 fusion. In SkMC 2-day-old cultures, the myoblasts are still in multiplication and  
243 differentiation process. Cadherin is strongly revealed in every cell with higher  
244 fluorescence intensity in edges near the membrane and at the point of cell-cell contact  
245 (Fig. 3A). Apparently, the existence of a single, newly internalized parasite did not lead to  
246 any change in the profile of cadherin distribution in host cells (Fig. 3B), as demonstrated  
247 by immunofluorescence microscopy. The same results were maintained during the first 3

248 h of interaction (data not shown). After differentiation, myoblasts revealed cadherin highly  
249 concentrated at the cell-cell contact point (Fig. 4A). However, this profile was not  
250 observed after 24 h of *T. gondii* infection. Besides disorganization, cadherin appeared in  
251 aggregates at different points of the SkMC, including around and inside the  
252 parasitophorous vacuole (Fig. 4B and C - inset). Infected myoblasts showed little or no  
253 labeling for cadherin at cell-cell contact point (Fig. 4B and inset and C). Even in cultures  
254 infected for 36 h, only uninfected cells present strong cadherin expression (Fig. 4D).

255 During myogenesis *in vitro*, myoblasts interact with the surface of myotubes. The  
256 dynamics of this interaction induces the translocation of cadherin from the extremities of  
257 myotubes to the point of cell-cell contact (Fig. 5A, B and inset). Labeling for cadherin was  
258 observed at the end of infected myotubes, especially at points of contact with uninfected  
259 myoblasts, suggesting migration of cadherin to the sites of possible membrane fusion  
260 (Fig. 5C-E).

261

### 262 **Western blot analysis of cadherin expression in SKMC infected with *T. gondii***

263 The total cadherin pool was detected using a pan-cadherin-specific antibody, which  
264 recognizes the 130 kDa protein [27], since proteins were extracted from 2-3-day-old  
265 uninfected cultures (controls) and *T. gondii* 24 h infected cultures. Quantitative data  
266 obtained by densitometric analysis showed that 3-day-old SkMC presented a reduction  
267 of only 10% in the synthesis of cadherin when compared to 2-day-old cultures.  
268 Regarding the participation of *Toxoplasma* in the modulation of cadherin synthesis, our  
269 data showed a significant decline of cadherin expression after 24 h of *T. gondii*-SkMC  
270 interaction, reaching a 54% reduction. These data demonstrate the variable rate of  
271 changes between infected and control SkMC during the analyzed period (Fig. 6). For  
272 quantitative analysis, western blot signals were normalized against total proteins

273 detected per lane in the corresponding MemCode stained membrane using the  
274 QuantityOne software (not shown).

275

### 276 **RT-PCR analysis of M-cadherin mRNA in SkMC- *T. gondii* infected cells**

277 M-cadherin gene expression in SkMC experimentally infected with *T. gondii* was  
278 analyzed by RT-PCR. M-cadherin mRNA was detected 2 and 3 days after plating and it  
279 was up regulated only after the induction of myotube formation, which corresponds to the  
280 second day of culture. After 3 h of infection with *T. gondii* M-cadherin mRNA levels were  
281 significantly reduced and after 12 h of interaction, no change in M-cadherin mRNA  
282 expression profile was observed. However, after 24 h, M-cadherin mRNA expression  
283 was down regulated when compared to the corresponding SkMC control from 3 day-old  
284 cell cultures (Fig. 7A-C).

285

### 286 **Discussion**

287 This study analyzes the impact of *T. gondii*-infection on the myogenesis process.  
288 The results obtained showed that: (i) myoblasts are more susceptible to infection than  
289 myotubes; (ii) *T. gondii*-infected myoblasts are unable to fuse with others myoblasts and  
290 myotubes and, (iii) M-cadherin expression is down regulated during infection, indicating  
291 that *T. gondii* interferes with myogenesis in SkMC model.

292 We have observed that after 24 h of *T. gondii*-SkMC interaction, myoblasts are  
293 more infected than myotubes. This difference in infection levels possibly reflects the  
294 participation of cell surface molecules from both the parasite and host cells, acting as  
295 receptors/ligands, such as intercellular adhesion proteins with Ig domains (I-CAM, N-  
296 CAM and V-CAM) [36, 37]. During infection and transmigration, *T. gondii* interacts with  
297 IgCAMs through the adhesion protein MIC2 released from micronemes, suggesting that

298 the parasite infectivity capacity is at least partially dependent on the I-CAM molecules  
299 present on the host cell surface [38]. It has been established that during *in vivo*  
300 differentiation of skeletal muscle cells, a change in the expression profile of adhesion  
301 molecules occurs: N-CAM and V-CAM, as well as cadherins, which are found in higher  
302 concentration in myoblasts than myotubes and in adult muscular fibers [27, 29, 39-44].  
303 These data suggest that the different susceptibility of SkMC myoblasts and myotubes to  
304 infection by *T. gondii* tachyzoites can be related to the remodeling of adhesion molecule  
305 expression profiles on host cell surfaces during their differentiation.

306 The reproduction of the myogenesis process from mammalian embryonic skeletal  
307 muscle cells was demonstrated, as previously reported in both *in vivo* and *in vitro* studies  
308 [45-47]. It is well known that cadherin plays important roles in morphogenesis, such as  
309 cell recognition and cell rearrangement including myogenesis, both in the embryo and in  
310 the adult organism during regeneration [20, 43, 48]. Our results corroborated previous  
311 findings demonstrating that antibodies against cadherin protein recognize the same 130  
312 kDa protein [27]. The 10% reduction observed in the synthesis of cadherin in 2- and 3  
313 day-old cultures can be justified since, after 2 days of plating, some myoblasts have  
314 completed their proliferation and recognition programs [26]. In this manner, the infection  
315 carried out in cultures after 2 days of plating allowed the study of the role of *Toxoplasma*  
316 in cadherin modulation and inhibition of myogenesis.

317 We also demonstrated, by immunofluorescence, the distribution of cadherin  
318 throughout the myoblast surface, being more concentrated in aligned myoblasts and  
319 strongly localized at the point of cell-cell contacts. In young and mature myotubes,  
320 cadherin molecules were labeled on the sarcolemma and specifically accumulated at the  
321 extremities and on insertion sites of secondary myotubes [27, 29, 41-44]. In all SkMC  
322 (myoblasts and myotubes), no change was observed with respect to the cadherin



323 distribution pattern during the first 3 h of interaction with *T. gondii*. However, infection of  
324 SkMC with *T. gondii* for more than 24 h resulted in the disruption of cadherin mediated  
325 cell junction with a sharp decline in the total cadherin pool. Our results showing, by  
326 confocal microscopy, the presence of cadherin around and inside the parasitophorous  
327 vacuole, open new perspectives to study the involvement of this adhesion protein during  
328 the interaction of *T. gondii* and muscle cells and also other cellular types not involved  
329 with the chronic phase of the disease.

330 In agreement with our immunofluorescence results, western blot analysis of  
331 cadherin expression showed no alteration in protein levels on newly infected myoblasts  
332 and myotubes (not shown). Nevertheless, a decrease in protein levels was observed  
333 after 24 h of interaction with *T. gondii*, which could lead to membrane fusion inhibition,  
334 interfering with the recognition process and fusion of myoblasts. Cultures analyzed after  
335 24 h of *T. gondii* interaction, showed that the parasite can induce a reduction of more  
336 than 50% in cadherin protein expression, thus interfering with the myogenesis process.

337 Regarding the negative modulation of cadherin protein expression after 24 h of *T.*  
338 *gondii*-SkMC interaction, observed by western blot analysis, one factor that must be  
339 considered is the activation of proteolytic systems. It is known that, during the *T. gondii*  
340 lytic cycle proteolytic systems can be activated by molecules involved in the fusion  
341 process, including calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [49, 50]. Previous works showed that, in response  
342 to the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase in *T. gondii* infected cells, there is an up-regulation of  
343 calpain activity which is involved in many biological events, including cell migration and  
344 muscle cell differentiation [51-54]. Thus, we suggest that in SkMC infected by *T. gondii*  
345 tachyzoite forms, the reduction observed in the cadherin expression profile may be,  
346 among other factors, due to modulation by  $\text{Ca}^{2+}$  levels leading to an increase of calpain-3  
347 proteolytic activity [48, 54, 55]. We believe that *T. gondii*, like other pathogens, can

348 benefit from the modulation of cadherin and other adhesion molecules in order to  
349 facilitate migration to other neighboring cells and tissue.

350 Intracellular pathogens, such as *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*  
351 *typhimurium*, *Trypanosoma cruzi* and *Chlamydia trachomatis* may modulate the adhesion  
352 junction molecules, such as E-cadherin, claudin-1, ZO-1, N-cadherin and nectin-1  
353 affecting the adherent junctions [21, 23, 24, 56-61]. However, this is not always a  
354 consistent behavior. For example, it was observed that in *Trichinella pseudospiralis*  
355 infected satellite cells from muscle cells, M-cadherin was up regulated; the same was not  
356 observed for *T. spiralis*, and the authors suggested a differential M-cadherin role in the  
357 infection process by different pathogens [25]. Similar to our immunofluorescence results,  
358 other authors have observed low or no staining for Pan- and N-cadherin in  
359 cardiomyocytes highly infected with *T. cruzi* leading to disruption of cadherin-mediated  
360 adherent junctions [24]. In our study, *T. gondii* infected SkMC after 3 and 24 h of  
361 interaction showed a significant reduction in cadherin mRNA levels, suggesting that *T.*  
362 *gondii* could be involved in the modulation of M-cadherin gene transcription. It has  
363 recently been described that *T. gondii* manipulates host signaling pathways, deploying  
364 parasite kinases and phosphatases and alters host cell gene transcription through  
365 rhoptry proteins [62, 63]. An example is ROP16 that manipulates the host cell  
366 transcription factors STAT3 and STAT6 in the early infection. The rhoptry proteins may  
367 alter host cell gene transcription and set up an environment that favors *Toxoplasma*  
368 replication and survival. Another example is the inhibition of STAT1 during *T. gondii*  
369 interaction, which possibly increases its pathogenicity [62, 63, 64].

370 During embryonic development the formation and maintenance of muscle tissues  
371 primarily requires the action of adhesion proteins such as cadherins [43]. In our *in vitro*  
372 studies using SkMC we verified that *T. gondii* affected the myogenesis process by

373 negatively regulating cadherin expression. Thus, we believe that our results can  
374 contribute to a further investigation of congenital infection by *Toxoplasma* during the  
375 embryonic formation of muscle tissue.

376

## 377 **Conclusions**

378 The data of this paper reveal that during the interaction between *T. gondii*  
379 tachyzoite forms and primary culture of SkMC, myoblasts are more susceptible to  
380 infection than myotubes. These data suggest that the different susceptibility of SkMC  
381 myoblasts and myotubes to infection by *T. gondii* can be related: (i) to the remodeling of  
382 the host cell's surface adhesion molecule expression profiles during their differentiation;  
383 (ii) to the participation of cell surface molecules from both parasite and host cells, acting  
384 as receptors/ligands, such as N-CAM and V-CAM, as well cadherins, which are found in  
385 higher concentration in myoblasts than myotubes and in adult muscular fibers [27, 29,  
386 39, 40, 41, 42]. We also demonstrated that *T. gondii* SkMC infection down regulates M-  
387 cadherin mRNA expression, leading to molecular modifications in the host cell surface  
388 which disarray the contact sites between myoblasts and myoblasts-myotubes, promoting  
389 the instability of the junctions, which interferes with membrane fusion and consequently  
390 inhibiting the myogenesis process. These changes, could lead to the modulation of other  
391 molecules contributing to toxoplasmosis pathogenesis in the muscle tissue.

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404 **Authors' contributions**

405  
406 HSB conceived, participated in the design and coordination of the study and had the  
407 general supervision and complete overview of the project. AFG co-conceived the study,  
408 carried out most of the experimental work, including the processing of samples and the  
409 final illustrations for the manuscript, analyzed data and drafted the manuscript, as part of  
410 her PhD thesis. EVG and LC participated in the design of the study. JRC performed  
411 western blot analysis. LML carried out the molecular assays. All authors analyzed the  
412 data and read and approved the final manuscript.

413

414 **Acknowledgments.** The authors thank Carlos Alberto Bizarro Rodrigues from  
415 Farmanguinhos/Fiocruz for the production of interferential microscopy images and Pedro  
416 Paulo Manso and Dr. Marcelo Pelajo from PDTIS-Fiocruz Confocal Microscopy Platforms.  
417 We are grateful to Sandra Maria de Oliveira Souza and Priscila Lemos for technical  
418 assistance. This work was supported with grants from Conselho Nacional de  
419 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Edital Universal MCT/CNPq nº  
420 014/2008, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de  
421 Janeiro (FAPERJ), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Fundação  
422 Oswaldo Cruz (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES IV),  
423 Pronex - Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – CNPq/FAPERJ and Instituto  
424 Oswaldo Cruz/Fiocruz.

425 The authors declare that they have no competing interests.

426

427

428

429

430

431 **References**

- 432 1. Sukthana Y: **Toxoplasmosis: beyond animals to humans.** *Trends Parasitol* 2006,  
433 **22**:137-142.
- 434 2. Barragan A, Sibley LD: **Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers.**  
435 *Trends Microbiol* 2003,**11**:426-430.
- 436 3. Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, Bourland DD,  
437 Uttamchandani R, Fuhrer J, Jacobson J: **Toxoplasmic encephalitis in patients with the**  
438 **acquired immunodeficiency syndrome.** *N Engl J Med* 1993,**329**:995-1000.
- 439 4. Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier MNJr, Belfort R  
440 Jr: **Ocular toxoplasmosis: na update and review of the literature.** *Mem Inst Oswaldo*  
441 *Cruz* 2009,**104**:345-350.
- 442 5. Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS: **Primary culture of skeletal muscle cells**  
443 **as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis.** *J Parasitol* 2008,**94**:72-  
444 83.
- 445 6. Guimarães EV, Carvalho L, Barbosa HS: **Interaction and cystogenesis of**  
446 ***Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*  
447 2009,**140**:170-174.
- 448 7. Ferreira-da-Silva MF, Barbosa HS, Groß U, Lüder CG: **Stress-related and**  
449 **spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*.** *Molecular Biosystems*  
450 2008,**4**:824-834.
- 451 8. Ferreira-da-Silva MF, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho L, Groß U, Lüder CG,  
452 Barbosa HS: **Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma***  
453 ***gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation.** *Mem Inst*  
454 *Oswaldo Cruz* 2009a,**140**:196-200.

- 455 9. Ferreira-da-Silva MF, Takács AC, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG: **Primary skeletal**  
456 **muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite**  
457 **conversion at higher rates than fibroblasts.** *Int J Med Microbiol* 2009b,**299**:281-288.
- 458 10. Remington JS, Cavanaugh EN: **Isolation of the encysted form of *Toxoplasma***  
459 ***gondii* from human skeletal muscle and brain.** *N Engl J Med* 1965,**273**:1308-1310.
- 460 11. Karasawa T, Takizawa I, Morita K, Ishibashi H, Kanayama S, Shikata T:  
461 **Polymyositis and toxoplasmosis.** *Acta Pathol Jpn* 1981,**31**:675-680.
- 462 12. Cuturic M, Hayat GR, Vogler CA, Velasques A: **Toxoplasmic polymyositis revisited,**  
463 **case report and review of literature.** *Neuromuscul Disord* 1997,**7**:390-396.
- 464 13. Gherardi R, Baudrimont M, Lionnet F, Salord JM, Duvivier C, Michon C, Wolff M,  
465 Marche C: **Skeletal muscle toxoplasmosis in patients with acquired**  
466 **immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study.** *Ann Neurol*  
467 1992,**32**:535-542.
- 468 14. Hassene A, Vital A, Anghel A, Guez S, Series C: **Acute acquired toxoplasmosis**  
469 **presenting as polymyositis and chorioretinitis in immunocompetent patient.** *Joint*  
470 *Bone Spine* 2008,**75**:603-605.
- 471 15. Barbosa HS, Andrade EF, Carvalho L: **Ultrastructural aspects of the *Toxoplasma***  
472 ***gondii*-skeletal muscle cells interaction.** *Mol Biol Cell* 1999,**10**:182.
- 473 16. Barbosa HS, Ferreira-Silva MF, Guimarães EV, Carvalho L, Rodrigues RM: **Absence**  
474 **of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear**  
475 **localization.** *J Parasitol* 2005,**91**:182-184.
- 476 17. Andrade EF, Stumbo AC, Monteiro-Leal LH, Carvalho L, Barbosa HS: **Do**  
477 **microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in**  
478 **skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion?** *J Submicrosc*  
479 *Cytol Pathol* 2001,**33**:337-341.

- 480 18. Kokta TA, Dodson MV, Gertler A, Hill RA: **Intercellular signaling between adipose**  
481 **tissue and muscle tissue.** *Domest Anim Endocrinol* 2004,**27**:303-331.
- 482 19. Charge SB, Rudnicki MA: **Cellular and molecular regulation of muscle**  
483 **regeneration.** *Physiol Rev* 2004,**84**:209-238.
- 484 20. Gumbiner BM: **Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.** *Nat*  
485 *Rev Mol Cell Biol* 2005,**6**:622-634.
- 486 21. Soler AP, Gilliard G, Xiong Y, Knudsen KA, Martin JL, De Suarez CB, Mota Gamboa  
487 JD, Mosca W, Zoppi LB: **Overexpression of neural cell adhesion molecule in Chagas'**  
488 **myocarditis.** *Hum Pathol* 2001,**32**:149-155.
- 489 22. Costa RF, de Souza WM, Benchimol JF, Alderete JA, Morgado-Diaz: ***Trichomonas***  
490 ***vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells.** *Cell Res* 2005,**15**:704-  
491 716.
- 492 23. Bebb JR, Leach L, Zaitoun A, Hand N, Letley DP, Thomas R, Atherton JC: **Effects of**  
493 ***Helicobacter pylori* on the cadherin–catenin complex.** *J Clin Pathol* 2006,**59**:1261-  
494 1266.
- 495 24. Melo TG, Meirelles MN, Pereira MC: ***Trypanosoma cruzi* alters adherens junctions**  
496 **in cardiomyocytes.** *Microbes Infect* 2008,**10**:1405-1410.
- 497 25. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y: **Candidate genes responsible for common and**  
498 **different pathology of infected muscle tissues between *Trichinella spiralis* and *T.***  
499 ***pseudospiralis* infection.** *Parasitol Int* 2008,**57**:368-378.
- 500 26. Donalies M, Cramer M, Ringwald M, Starzinski-Powitz A: **Expression of M-cadherin,**  
501 **a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of**  
502 **skeletal muscle cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1991,**15**:8024-8028.

- 503 27. Eng H, Herrenknecht K, Semb H, Starzinski-Powitz A, Ringertz N, Gullberg D:  
504 **Effects of divalent cations on M-cadherin expression and distribution during**  
505 **primary rat myogenesis *in vitro*. *Differentiation* 1997,61:169-176.**
- 506 28. Charrasse S, Comunale F, Grumbach Y, Poulat F, Blangy A, Gauthier-Rouvière C,  
507 **RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell***  
508 **2006,17:749-759.**
- 509 29. Rose O, Rohwedel J, Reinhardt S, Bachmann M, Cramer M, Rotter M, Wobus A,  
510 Starzinski-Powitz A: **Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during**  
511 **prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture.**  
512 ***Dev Dyn* 1994,201:245-259.**
- 513 30. Magalhães KG, Passos LK, Carvalho-Odos S: **Detection of *Lymnaea columella***  
514 **infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mem Inst Oswaldo Cruz***  
515 **2004,99:421- 424.**
- 516 31. Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ: ***Toxoplasma gondii* infection induces gene**  
517 **expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage**  
518 **colony stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal**  
519 **pigment epithelial cells. *Infect Immun* 2000,68:407-410.**
- 520 32. Nishikawa Y, Xuenan X, Makala L, Vielemeyer O, Joiner KA, Nagasawa H,  
521 **Characterisation of *Toxoplasma gondii* engineered to express mouse interferon-**  
522 **gamma. *Int J Parasitol* 2003,33:1525-1535.**
- 523 33. Okomo-Adhiambo M, Beattie C, Rink A: **cDNA microarray analysis of host-**  
524 **pathogen interactions in a porcine *in vitro* model for *Toxoplasma gondii* infection.**  
525 ***Infect Immun* 2006,74:4254-4265.**



- 526 34. Taubert A, Zahner H, Hermosilla C: **Dynamics of transcription of**  
527 **immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian**  
528 **parasites.** *Vet Parasitol* 2006a,**142**:214-222.
- 529 35. Taubert A, Krüll M, Zahner H, Hermosilla C: ***Toxoplasma gondii* and *Neospora***  
530 ***caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion**  
531 **molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion.** *Vet Immunol*  
532 *Immunopathol* 2006,**112**:272-283.
- 533 36. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T: **Cytokines differentially**  
534 **regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts.** *Clin Exp*  
535 *Immunol* 2006,**144**:494-502.
- 536 37. Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, Brigitte M, Poron F, Authier F, Chretien F, Gherardi  
537 RK, Chazaud B: **Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from**  
538 **apoptosis through a set of adhesion molecular systems.** *J Cell Sci* 2006,**119**:2497-  
539 2507.
- 540 38. Charron AJ, Sibley LD: **Molecular partitioning during host cell penetration by**  
541 ***Toxoplasma gondii*.** *Traffic* 2004,**5**:855-867.
- 542 39. Levi G: **Cell adhesion molecules during *Xenopus* myogenesis.** *Cytotechnology*  
543 1993,**11**:91-93.
- 544 40. Levi G, Simonneau L, Saint-Jeannet JP, Thiery JP: **Molecular transitions**  
545 **accompanying growth of the axial musculature of *Xenopus laevis*.** *C R Acad Sci III*  
546 1993,**316**:822-837.
- 547 41. Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A: **Expression pattern of M-**  
548 **cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles.** *Dev Dyn*  
549 1994,**199**:326-337.

- 550 42. Jesse TL, LaChance R, Iademaro MF, Dean DC: **Interferon regulatory factor-2 is a**  
551 **transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell**  
552 **adhesion molecule-1.** *J Cell Biol* 1998,**140**:1265-1276.
- 553 43. Kaufmann U, Martin B, Link D, Witt K, Zeitler R, Reinhard S, Starzinski-Powitz A: **M-**  
554 **cadherin and its sisters in development of striated muscle.** *Cell Tissue Res* 1999,**296**:  
555 191-198.
- 556 44. Curci R, Battistelli M, Burattini S, D'Emilio A, Ferri P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Ambrogini  
557 P, Cuppini R, Falcieri E: **Surface and inner cell behaviour along skeletal muscle cell**  
558 **in vitro differentiation.** *Micron* 2008,**39**:843-851.
- 559 45. Meirelles MNL, Barbosa HS, De Souza W, Araujo Jorge TC: **Recent contributions**  
560 **for a better understanding of the *Trypanosoma cruzi*-muscle cell interaction.**  
561 *Memórias Inst Oswaldo Cruz* 1984,**79**:7-11.
- 562 46. Araújo Jorge TC, Barbosa HS, Moreira AL, De Souza W, Meirelles MN: **The**  
563 **interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with**  
564 **myoblasts and fibers of skeletal muscle.** *Z Parasitenkd* 1986,**72**:577- 584.
- 565 47. Araya R, Riquelme MA, Brandan E, Sáez JC: **The formation of skeletal muscle**  
566 **myotubes requires functional membrane receptors activated by extracellular ATP.**  
567 *Brain Res Brain Res Rev* 2004,**47**:174-188.
- 568 48. Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Spencer MJ: **Regulation of the M-cadherin-**  
569 **beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic**  
570 **differentiation.** *Mol Cell Biol* 2006,**26**:8437-8447.
- 571 49. Gail M, Groß U, Bohne W: **Transcriptional profile of *Toxoplasma*-infected human**  
572 **fibroblasts assessed by gene array hybridization.** *Mol Genet Gen* 2001,**265**:905-912.
- 573 50. Arrizabalaga G, Boothroyd JC: **Role of calcium during *Toxoplasma gondii***  
574 **invasion and egress.** *Int J Parasitol* 2004,**9**:361-368.

- 575 51. Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M: **Properties of**  
576 **myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal**  
577 **sheep.** *J Anim Sci* 2001,**79**:2097-2107.
- 578 52. Glading A, Lauffenburger DA, Wells A: **Cutting to the chase: calpain proteases in**  
579 **cell motility.** *Trends Cell Biol* 2002,**12**:46-54.
- 580 53. Liu X, Schnellmann RG: **Calpain mediates progressive plasma membrane**  
581 **permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin**  
582 **during renal cell death.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003,**304**:63-70.
- 583 54. Dedieu S, Poussard S, Mazeret G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ:  
584 **Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell**  
585 **attachment and cytoskeletal organization.** *Exp Cell Res* 2004,**292**:187-200.
- 586 55. Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A, Benyamin Y: **m-Calpain implication in cell**  
587 **cycle during muscle precursor cell activation.** *Exp Cell Res* 2004,**298**:48-57.
- 588 56. Jepson MA, Collares-Buzato CB, Clark MA, Hirst BH, Simmons NL: **Rapid disruption**  
589 **of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with**  
590 **structural modification of intercellular junctions.** *Infect Immun* 1995,**63**:356-359.
- 591 57. Terres AM, Pajares JM, O'Toole D, Ahern S, Kelleher D: ***H. pylori* infection is**  
592 **associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell**  
593 **adhesion and proliferation control.** *J Clin Pathol* 1998,**51**:410-412.
- 594 58. Sears CL: **Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V.**  
595 **Assault of the tight junction by enteric pathogens.** *Am J Physiol Gastrointest Liver*  
596 *Physiol* 2000,**279**:1129-1134.
- 597 59. Prozialeck WC, Fay MJ, Lamar PC, Pearson CA, Sigar I, Ramsey KH: ***Chlamydia***  
598 ***trachomatis* disrupts N-cadherin dependent cell-cell junctions and sequesters b-**  
599 **catenin in human cervical epithelial cells.** *Infect Immun* 2002,**70**:2605-2613.

- 600 60. Sakaguchi T, Kohler H, Gu X, McCormick BA, Reinecker HC: ***Shigella flexneri***  
601 **regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells.** *Cell*  
602 *Microbiol* 2002,**4**:367-381.
- 603 61. Sun J, Kintner J, Schoborg RV: **The host adherens junction molecule nectin-1 is**  
604 **downregulated in *Chlamydia trachomatis*-infected genital epithelial cells.**  
605 *Microbiology* 2008,**54**:1290-1299.
- 606 62. Saeij JP, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC: **Toxoplasma co-**  
607 **opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue.** *Nature*  
608 2007,**445**:324-327.
- 609 63. Laliberté J, Carruthers VB: **Host cell manipulation by the human pathogen**  
610 ***Toxoplasma gondii*.** *Cell Mol Life Sci* 2008,**65**:1900-1915.
- 611 64. Sibley LD, Qiu W, Fentress S, Taylor SJ, Khan A, Hui R: **Forward genetics in**  
612 ***Toxoplasma gondii* reveals a family of rhoptry kinases that mediates pathogenesis.**  
613 *Eukaryot Cell* 2009,**8**:1085-1093.

614

615

616 **Legends**617 **Fig. 1 - Percentage of *T. gondii* infected SkMC after 24 h of interaction. (A)**

618 Percentage of myoblasts (61%) and myotubes (38%) infected with *T. gondii* after 24 h of  
619 interaction. Student's T-test (\*)  $p \leq 0.05$ . (B) Details of the profile of SkMC cultures  
620 observed by fluorescence microscopy with phalloidin-TRITC labeling showing actin  
621 filaments in red; nuclei of the cells and the parasites labeled with DAPI, in blue. Infected  
622 cultures present myoblasts containing several parasites (thick arrow) and young  
623 myotubes with 2 nuclei without parasites (thin arrows). Bars, 20  $\mu\text{m}$

624

625 **Fig. 2 - Quantitative analysis of the percentage of myotube formation during**  
626 **myogenesis in *T. gondii* infected cultures.** (A) In uninfected cultures, after 3 days, the  
627 percentage of myotubes was 19.5% while in infected cultures, after 24 h of interaction,  
628 this percentage decreased to 2.5%. Note the 75% reduction in the formation of myotubes  
629 in infected cultures. Student's T-test (\*)  $p=0.0025$ . (B) Differential interference contrast  
630 (DIC) image showing influence of the infection by *T. gondii* (24 h of interaction) on SkMC  
631 myogenesis. Parasite (thick arrows) and unfused myocytes (thin arrows).

632

633 **Fig. 3 - Localization of cadherin in primary SkMC cultures.** Indirect  
634 immunofluorescence assays showing: (A) 2-day-old myoblasts under multiplication and  
635 differentiation. Cadherin (in green) is strongly marked in every cell with high  
636 concentrations in edges near the membrane and points of cell-cell contact (arrows). (B)  
637 apparently, the existence of a single newly internalized parasite (inset) did not lead to any  
638 change in the profile of cadherin expression and distribution in host cells (arrow). Nuclei of  
639 cells and parasites are labeled with DAPI, in blue. Bars, 20  $\mu\text{m}$

640

641 **Fig. 4 - Cadherin distribution in SkMC after 24 h of interaction with *T. gondii*.**  
642 Confocal Microscopy analysis showing: (A) In 3-day-old SkMC cultures, after  
643 differentiation, myoblasts present intense cadherin labeling at the contact points (arrows).  
644 (B and C) In myoblasts after 24 h of interaction with *T. gondii* (thick arrow), cadherin (thin  
645 arrow) becomes disorganized forming aggregates at different sites, around and inside the  
646 parasitophorous vacuole (for detail, see inset). (D) Infected myoblasts after 24 h of  
647 interaction with *T. gondii* have little or no labeling for cadherin at points of cell-cell contact  
648 (thick arrow). Note that only uninfected cells show strong cadherin expression (thin  
649 arrow). Nuclei of cells and parasites labeled with DAPI, in blue. Bars, 20  $\mu\text{m}$

650 **Fig. 5 - Cadherin profile in differentiated cultures after more than 24 h of interaction**  
651 **with *T. gondii*.** (A and inset) Mature (arrowhead) and young myotubes in fusion process  
652 with myoblasts (arrows) can be observed by phase contrast microscopy. (B and inset) By  
653 fluorescence microscopy, cadherin (in green) appears distributed throughout the  
654 myotubes, being more concentrated at the cell membrane during adhesion, while mature  
655 myotubes alone show more intense labeling at the extremities. (C) Interferential  
656 microscopy shows the adhesion of uninfected myoblasts (arrowhead) with a mature  
657 infected myotube (thick arrows). (D) Confocal microscopy analysis shows that infected  
658 myoblasts do not reveal cadherin labeling and more infected myotubes present weaker  
659 cadherin labeling (arrow). Observe that despite the weak labeling, in infected myotubes  
660 cadherin molecules appear to migrate to the point of contact with uninfected myoblasts  
661 (arrowhead). (E) Merge. Bars, 20  $\mu\text{m}$

662

663 **Fig. 6 - Western blot analysis of cadherin protein expression.** (A) Percent index  
664 variance analysis of the western blot showing cadherin expression: (C1) 2-day old  
665 uninfected cultures , (C2) 3-day old uninfected SkMC (control), (I) cultures after 24 h of  
666 interaction with *T. gondii* tachyzoites, and (P) parasites alone (confirming the absence of  
667 synthesis of cadherin by *T. gondii* tachyzoites). Quantitative analysis revealed only 10%  
668 reduction in the expression of cadherin between normal cultures, reaching values of more  
669 than 50% reduction in *T. gondii* infected SkMC after 24 h. Results are representative of  
670 three independent experiments. Student's T-test (\*)  $p \leq 0.05$ .

671

672 **Fig. 7 - Profile of M-cadherin mRNA expression by SkMC experimentally infected**  
673 **with *T. gondii*.** (A) The arbitrary values presented in the graph are based on the  
674 densytometric analysis of the PCR gel image shown in panel B, corresponding to 3, 12

675 and 24 h of infection. Light bars indicate uninfected control cells and black bars indicate  
676 the infected cells. (B) Polyacrylamide, silver stained gels for visualization of the amplified  
677 M-cadherin and GAPDH mRNAs (from top to bottom, respectively). Lanes 1, 3 and 5  
678 show the profiles of negative controls and lanes 2, 4 and 6 the profiles of infected cells (3,  
679 12 and 24 h, respectively). NC, negative PCR control. Molecular size markers are  
680 indicated to the left. Student's T-test (\*)  $p \leq 0.05$ .

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

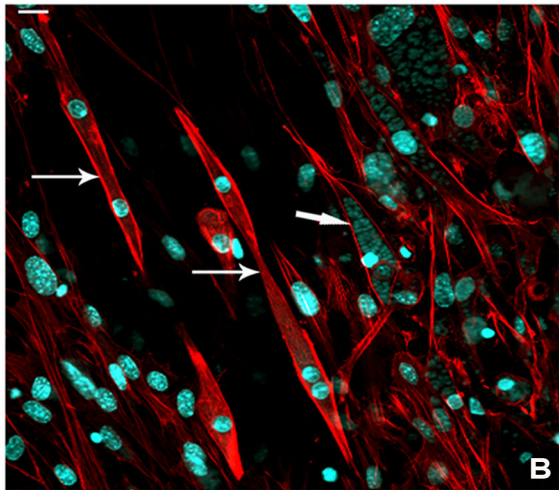
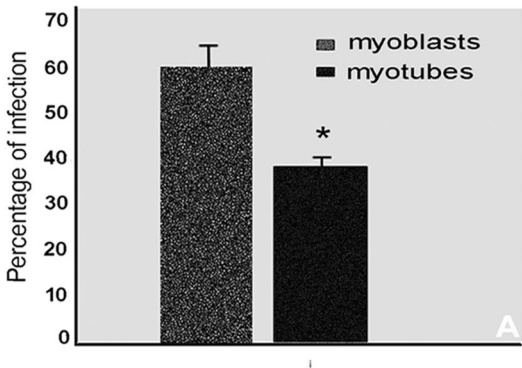


Figure 1



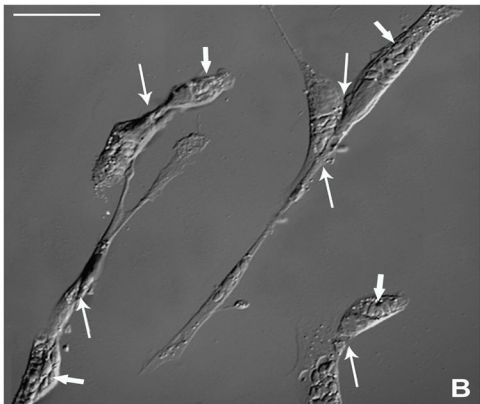
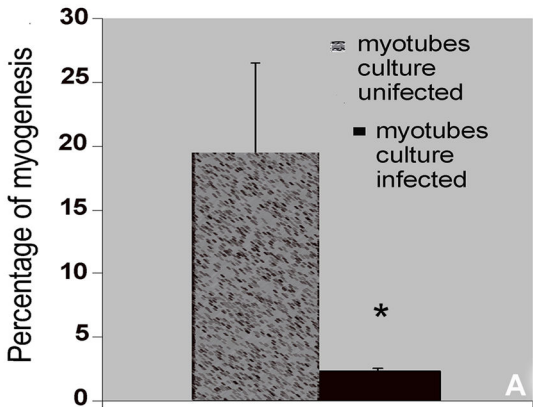
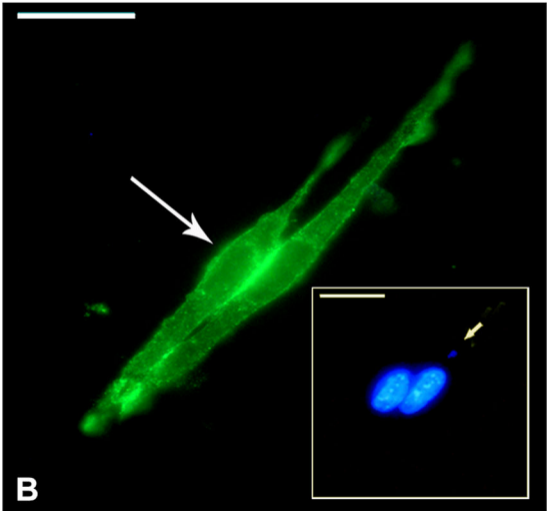
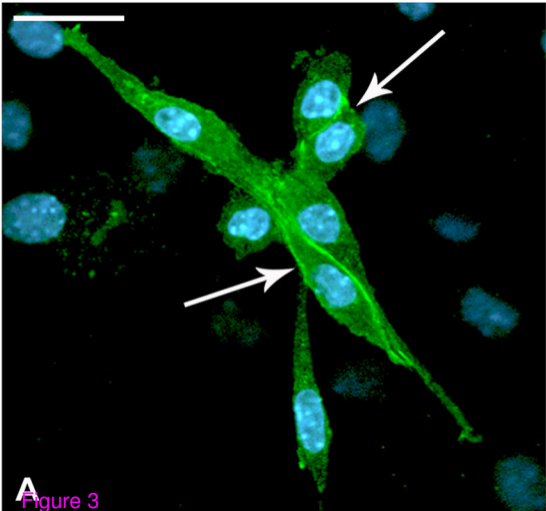
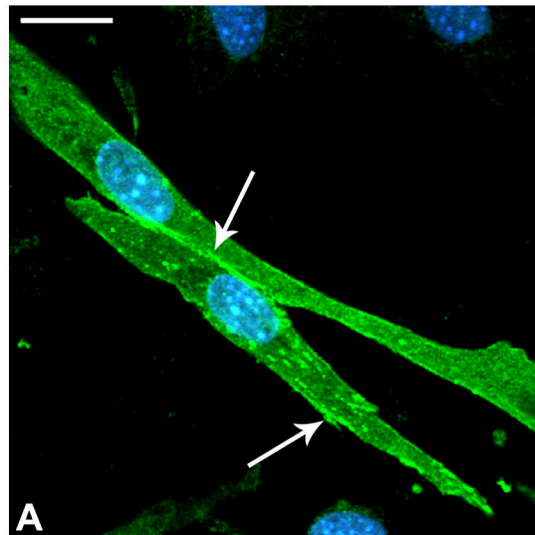
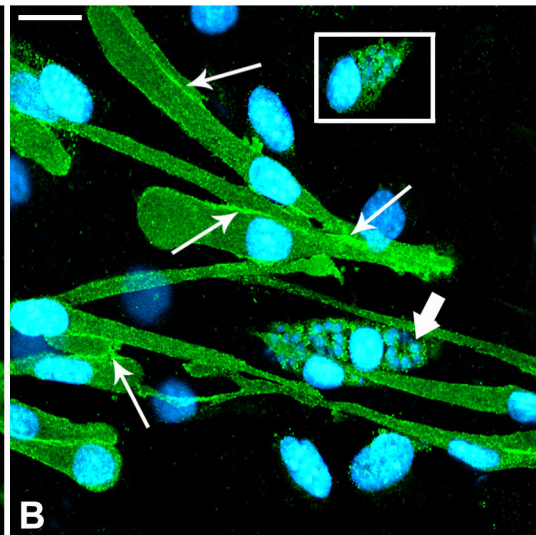


Figure 2

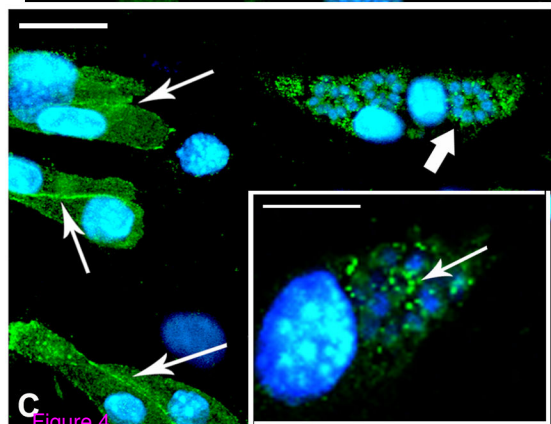




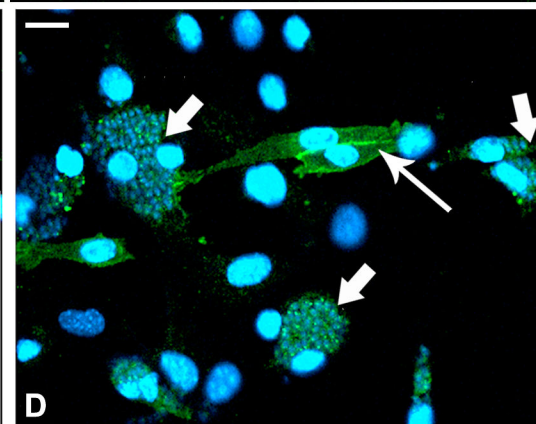
A



B



C



D

Figure 4

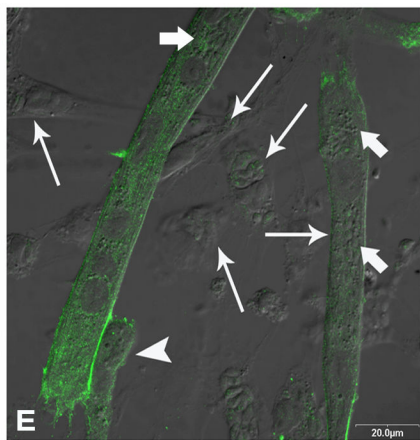
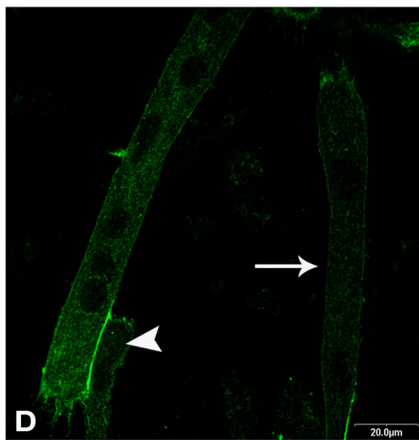
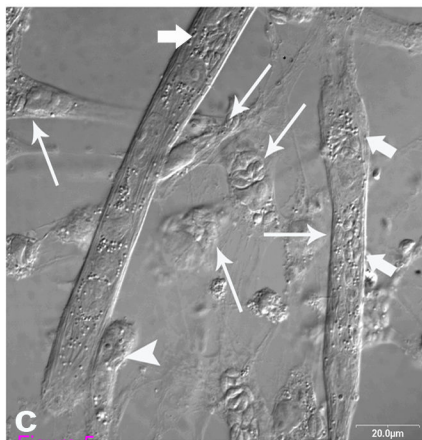
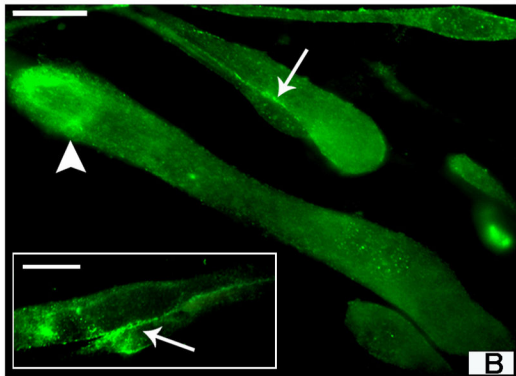
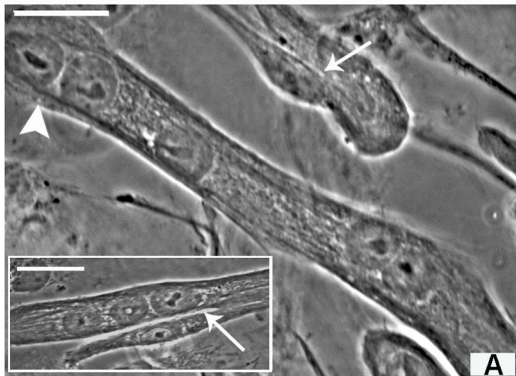


Figure 5

## Western blot - cadherin protein

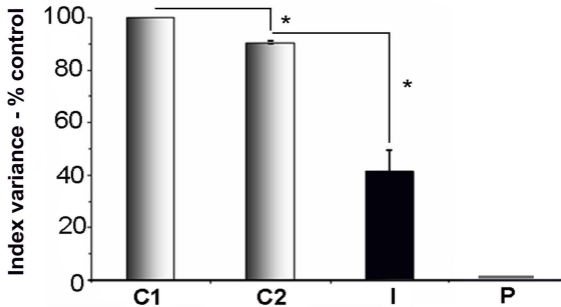


Figure 6

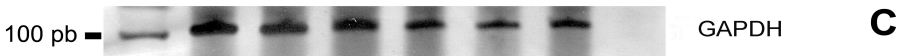
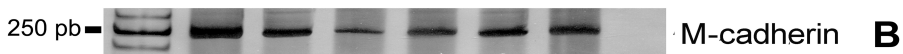
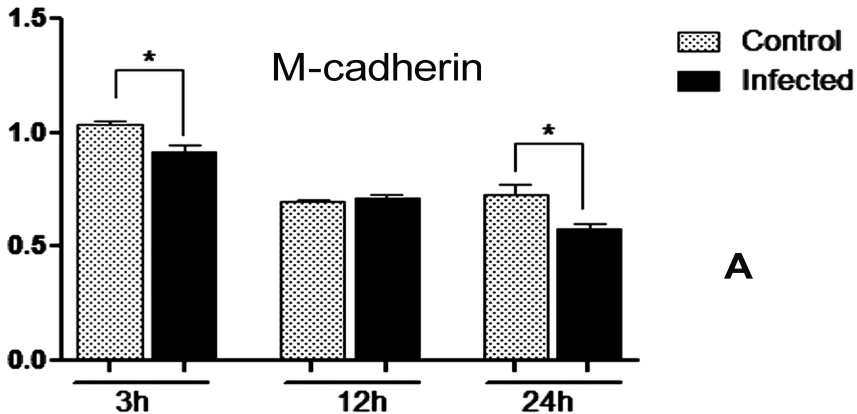


Figure 7

MW 1 2 3 4 5 6 NC

**Additional files provided with this submission:**

Additional file 1: Letter to Reviewers - BMC -20 marco end.docx, 22K  
<http://www.biomedcentral.com/imedia/1430277422531121/supp1.docx>

## ARTIGO II – IJMM

----- Mensagem Original -----

**Assunto: Submission Confirmation**

De: "IJMM Editorial Office" <intern.journal@uni-wuerzburg.de>

Data: Qua, 9 de Mar, 2011 10:49 am

Para: helene@ioc.fiocruz.br

-----

Dear Helene,

Your submission entitled "**Structural and molecular aspects of cytoskeleton proteins of skeletal muscle cells during infection by *Toxoplasma gondii***" has been received by International Journal of Medical Microbiology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijmm/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

**International Journal of Medical Microbiology - IJMM**



1 Running headline: Cytoskeleton proteins during *T. gondii*-SkMC interaction

2

3

4 **Structural and molecular aspects of cytoskeleton proteins of skeletal muscle**  
5 **cells during infection by *Toxoplasma gondii***

6

7 **Alessandra Ferreira Gomes <sup>a</sup>, Erick Vaz Guimarães <sup>a</sup>, José Raimundo Correa <sup>a</sup>,**  
8 **Cláudia Magalhães Calvet <sup>b</sup>, Leila Mendonça-Lima <sup>c</sup>, Helene Santos Barbosa <sup>a\*</sup>**

9

10 <sup>a</sup>*Laboratório de Biologia Estrutural*, <sup>b</sup>*Laboratório de Ultraestrutura Celular*, <sup>c</sup>*Lab. de*  
11 *Genômica Funcional e Bioinformática - Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz,*  
12 *Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

13

14

15 \*Correspondence to: Helene S. Barbosa, Lab Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz,  
16 Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil, CEP 21040-361. Fax:  
17 0055 21 2260-4434

18 Tel 0055 21 2598-4441 e-mail address: [helene@ioc.fiocruz.br](mailto:helene@ioc.fiocruz.br)

19

20

21

22

23

24

25 **Abstract**

26 Primary cultures of skeletal muscle cells (SkMC) reproduce myogenesis *in vitro*,  
27 and allow cellular and molecular approaches to the *Toxoplasma gondii*-host cell  
28 interaction. This cellular system is also an excellent model to investigate the  
29 participation of the SkMC cytoskeleton during the establishment of infection with *T.*  
30 *gondii*. In this work, the cytoarchitecture of SkMC was studied and the distribution of  
31 actin, tubulin, myosin and desmin proteins was analyzed by indirect  
32 immunofluorescence or fluorescence assays. The immunofluorescence technique  
33 demonstrated that the *T. gondii* infection of SkMC causes alterations to some of the  
34 cytoskeleton elements, such as the remodeling of tubulin, disassembly of actin filaments  
35 and myosin reorganization. RT-PCR tests showed no change in the synthesis of mRNA  
36 for desmin after 3, 12 and 24h of interaction; however the biochemical assays by  
37 Western blot demonstrated a reduction of 71% and 70% in the desmin protein  
38 expression after 3 and 24h of infection, respectively. Our data demonstrate a  
39 disorganization of the myofibrils in SkMC induced by the *T. gondii* infection. Also the  
40 multiplication of *Toxoplasma* in the host cell causes a disruption of physical barriers (for  
41 example cytoskeleton elements). This multiplication fosters the lytic cycle of *T. gondii*  
42 that corresponds by escaping from the host cell to infect other cells to guarantee new  
43 cellular cycles.

44  
45 **Keywords:** *Toxoplasma gondii*; skeletal muscle cells; cytoskeleton proteins; *T. gondii*-  
46 host cell interaction

47

48

49

## 50 **Introduction**

51 *Toxoplasma gondii* is an obligatory intracellular parasite and an important human  
52 pathogen. Humans acquire toxoplasmosis mainly by ingestion of cysts present in raw or  
53 poorly cooked meat; ingestion of oocysts from the feces of Felidae that contaminate  
54 food, water and soil and by tachyzoite infection through vertical transmission to the fetus  
55 during pregnancy (Tenter, 2009). In the first phase of the infection, tachyzoites multiply  
56 rapidly in many different types of host cells and the second phase of development  
57 results in the formation of tissue cysts. Tissue cysts have a high affinity for neural and  
58 muscular tissues (Dubey et al., 1998).

59 The interaction of *T. gondii* and primary cultures of skeletal muscle cells (SkMC)  
60 has been extensively exploited by our group. This *T. gondii*-SkMC interaction model  
61 reproduces important characteristics of the *in vivo* infection and also allows *in vitro*  
62 cystogenesis analysis (Andrade et al., 2001; Barbosa et al., 2005; Guimarães et al.,  
63 2008, 2009; Ferreira-da-Silva et al., 2008, 2009a, b). The involvement of muscular  
64 tissue in the chronic stage of toxoplasmosis is a significant clinical aspect for  
65 immunodeficient individuals infected with the HIV virus, and such muscular tissue can  
66 be used in biopsies for diagnosis, as proposed by Gherardi et al. (1992). Toxoplasmosis  
67 can cause myositis either by recent infection or by the reactivation of the infection,  
68 causing muscle injury and the release of parasites into the bloodstream (Cuturic et al.,  
69 1997). Polymyositis was reported in an immunocompetent patient diagnosed with  
70 acquired toxoplasmosis (Hasene et al., 2008).

71 The dynamics of SkMC obtained from mouse embryos allows the investigation of  
72 each stage of myogenesis. This process involves reorganization of the cytoskeleton  
73 giving rise to the sarcomere and formation of myofibrils (Tassin et al., 1985; Kokta et al.,  
74 2004; Charge and Rudnick, 2004; Bugnard et al., 2005). The sarcomere are repeated

75 contractile units that in the cytoplasm of SkMC form the myofibrils, giving the striated  
76 appearance to the skeletal myofibril which consists of thick and thin filaments of actin  
77 and myosin. In SkMC,  $\alpha$ -actin is in the I bands of the sarcomeres and during the  
78 process of contraction it associates with other proteins, such as myosin, located in the  
79 A-band (Clark et al., 2002; Sanger et al., 2002; 2005; 2010). Besides actin and myosin,  
80 other proteins are involved in the formation and organization of sarcomeres. Studies  
81 show that changes in myogenic cell morphology are related to microtubules (formed by  
82  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin proteins) (Bugnard et al., 2005) and intermediate filaments (IFs).  
83 Desmin is the predominant protein of SkMC I fs, mainly found in the Z line region of  
84 sarcomeres and is an important intermyofibrillar linking protein of SkMC. Desmin  
85 integrates the myofibril SkMC, the sarcolemma, the nucleus, the mitochondria, the  
86 microtubules and the microfilaments (Clark et al., 2002; Hijikata et al., 2003; Schröder  
87 and Schoser, 2009).

88 The cytoskeleton architecture of host cells is known to contribute to the  
89 establishment of infection by pathogens. Our data infers that during the *T. gondii*-SkMC  
90 infection there is a disruption of physical barriers favoring the lytic cycle of the parasite.

91

## 92 **Materials and Methods**

93 The procedures were carried out in accordance with the guidelines established  
94 by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), by Fundação Oswaldo  
95 Cruz-Fiocruz Committee of Ethics for the Use of Animals (license CEUA LW 10/10) and  
96 by the Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and  
97 Infectious Agents (NACLAR).

98

## 99 **Primary cultures of skeletal muscle cells**

100 SkMC cultures were obtained from thigh muscles of 18-day-old mouse embryos.  
101 The tissues were minced and incubated for 7 min with 0.05% trypsin and 0.01%  
102 versene diluted in phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS). After 5-7 dissociation  
103 cycles, the enzyme digestion was interrupted by addition of 10% fetal bovine serum.  
104 The suspension was centrifuged for 7 min at 650g, resuspended in Dulbecco's modified  
105 Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal calf serum, 2%  
106 chick embryo extract, 1 mM L-glutamine, 1,000 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin  
107 and then incubated for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, the  
108 culture flask was shaken gently to release non-attached cells and the supernatant,  
109 enriched with myoblasts, was seeded in 0.02% gelatin-treated 24-well culture plates for  
110 the fluorescent assays. The cultures were maintained at 37°C for up to 3-5 days to  
111 obtain the muscle fibers and fresh culture medium was added every two days (for  
112 details see Barbosa et al. (2000).

### 113 **Parasites**

114 Tachyzoites of *T. gondii*, RH strain, were maintained in Swiss mice by serial  
115 intraperitoneal inoculation of 10<sup>5</sup> parasites. After 48-72 h the parasites were harvested  
116 in PBS at room temperature and centrifuged (200g for 7-10 min) in order to discard any  
117 blood cells and cellular debris. The supernatant was collected and then centrifuged  
118 again at 1000g for 10 min. The final pellet was resuspended in DMEM and used in the  
119 parasite-host cell interaction assays.

120

### 121 **Quantitative analysis of infectivity of *T. gondii* in SkMC**

122 The quantitative analysis was carried out after 2 and 24h of *T. gondii*-SkMC  
123 interaction. The infection of SkMC with tachyzoites of *T. gondii* was performed with an  
124 approximate ratio of 5:1 (cell host:parasite). The quantification of infection was

125 calculated on the percentage of infected cells and the mean number of internalized  
126 parasites per cell infected. Three independent samples were analyzed.

127

### 128 **Fluorescence analysis of actin microfilaments**

129 Four-day-old SkMCs were interacted with tachyzoites 5:1 (cell host:parasite) for  
130 3 and 24h at 37°C. Non-infected and infected SkMC were fixed for 5 min at room  
131 temperature in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS. After fixation, the cultures  
132 were incubated with 0.1% Triton X-100 (Sigma) in PBS for permeabilization of  
133 membrane and better access to cytoskeleton proteins by phalloidin, and were washed 3  
134 times (10 min each) in the same buffer. Then, the cultures were incubated for 1h at  
135 37°C with 4 µg/ml phalloidin rhodamine in PBS. Thereafter, the cultures were washed  
136 for 10 min/3 times in PBS, incubated for 5 min in 0.1 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-  
137 phenylindole, Sigma), a DNA stain that enables the visualization of host and parasite  
138 nuclei, diluted 1:1000 in PBS and washed again in PBS. The coverslips were then  
139 mounted on slides with DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane-triethylenediamine  
140 antifading, Sigma) in PBS containing 50% glycerol, pH 7.2. The samples were  
141 examined in a confocal laser scanning microscope (CLSM Axiovert 510, META, Zeiss,  
142 Germany) using a 543helium laser (LP560 filter) and 405 Diiod laser (LP 420 filter).

143

### 144 **Immunofluorescence analysis of desmin, β-tubulin and myosin distribution in** 145 **SkMC during infection with *T. gondii***

146 Briefly, tachyzoites were interacted with 4-day-old SkMC in an approximate ratio of  
147 5:1 (cell host:parasite). After 3, 12 (only for desmin) and 24h of interaction, the cultures  
148 were fixed in 4% paraformaldehyde diluted in PBS for 5 min at room temperature and  
149 then washed 3 times (10 min each) with PBS. The cultures were incubated in blocking

150 solution containing 4% bovine serum albumin (BSA) and 0.5% Triton X100 (Sigma  
151 Chemical Co.) in PBS for 1h at room temperature, followed by incubation for 1h at 37°C  
152 with antibody anti-β-tubulin 1:100 (Sigma Chemical Co.- monoclonal T- 4026), anti-  
153 desmin 1:100 (Sigma Chemical Co.- monoclonal D-1033) and anti-myosin skeletal  
154 1:300 (SigmaChemical Co. - monoclonal M-4276), diluted in PBS/BSA. After incubation  
155 with the first antibody, the cultures were washed 3 times for 10 min in PBS/BSA 4% and  
156 incubated with Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Molecular Probes)  
157 diluted 1:1000 in PBS/BSA for 1h at 37°C. After tha t, the cultures were washed 3 times  
158 for 10 min in PBS, incubated for 10 min in a solution of PBS containing 0.1 µg/ml DAPI  
159 (4', 6-diamidino-2-phenylindole; Sigma Chemical Co.), a DNA stain that enables the  
160 visualization of host and parasite nuclei, and washed again in PBS. The coverslips were  
161 mounted on slides with 2.5% DABCO (1.4 Diazabicyclo [2.2.2] octane -  
162 triethylenediamine antifading; Sigma Chemical Co.) in PBS containing 50% glycerol, pH  
163 7.2. Controls were performed by omission of the primary antibody. The samples were  
164 examined in a confocal laser scanning microscope (CLSM Axiovert 510, META, Zeiss,  
165 Germany) or in a confocal laser scanning microscope (CLSM) Fluoview 3.2 Olympus  
166 using a 543helium laser (LP560 filter) and 405 Diiod laser (LP 420 filter).

167

### 168 **RNA extraction and reverse transcription-PCR (RT-PCR)**

169 Total RNA was extracted from SkMC culture samples harvested at three different  
170 times from the experimental *T. gondii* infection assay (after 3, 12 and 24h). For this  
171 purpose, 10<sup>6</sup> cells were harvested, washed three times in PBS and centrifuged at  
172 10,000 g. The supernatant was completely removed and the pellet obtained was used  
173 for RNA extraction with an RNeasy kit (Qiagen California, CA, USA) according to the  
174 manufacture's recommendations. Reverse transcription was carried using 2 µg of each

175 RNA sample and the Mix reagents acquired from BioRad (California, USA), following  
176 the manufacturer's instructions. For cDNA amplification, gene-specific primers, targeted  
177 to desmin (Collins et al., 1996) and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate  
178 dehydrogenase), as previously reported (Nagineeni et al., 2000; Nishikawa et al., 2003;  
179 Taubert et al., 2006a, 2006b) were used. PCR was carried out in an automatic DNA  
180 thermal cycler (Px2, Thermo Scientific Massachusetts, USA) in a final volume of 10  $\mu$ L,  
181 with 1 $\mu$ L target cDNA, 5 pmol of each primer, 200  $\mu$ M of deoxyribonucleoside  
182 triphosphates (dNTPs), Promega (Wisconsin, USA) and 0.8 units TaqDNA polymerase  
183 (Cenbiot, Rio Grande do Sul, Brazil) in a buffer containing 10 mM Tris - HCl, pH 8.5, 50  
184 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> as previously described (Magalhães et al., 2004). Negative  
185 controls without the addition of DNA were run in parallel. The samples were amplified  
186 for 30 cycles (denaturation at 94°C for 60 sec, annealing at 55 °C or 54°C for desmin  
187 and GAPDH, respectively) and extension at 72°C for 45 sec. PCR products were  
188 visualized on 8% silver stained polyacrylamide gels. Gel images were acquired (Epson  
189 Perfection 4180 Photo, California, USA) and densitometry determined by Image J  
190 software (NIH, GNU General Public License). The numerical data was statistically  
191 analyzed by the Student's t test using SoftMax 5.0. Three independent samples were  
192 analyzed.

193

#### 194 **Western blot analysis**

195 For desmin Western blot analysis 4-day old SkMC were interacted with *T. gondii*  
196 tachyzoites (1:5 host cell: parasite ratio) for 3 and 24h at 37°C. Uninfected controls were  
197 run in parallel for each time. Cells were washed with PBS and maintained on ice for  
198 protein extraction. Briefly, cells were collected in lysis buffer (50mM Tris-Cl pH 8,  
199 150mM NaCl, 100 $\mu$ g/mL PMSF, 1mg/mL pepstatin, 1mg/mL aprotinin, 10mg/mL



200 leupeptin in 1% Triton X-100, 0.4mg/mL EGTA). Cell debris was removed by  
201 centrifugation, the proteins in the cleared supernatant precipitated with cold acetone  
202 and were resuspended in 8M ureum/2% CHAPS. Total protein concentration was  
203 determined with an RC-DC kit (BioRad) prior to separation in 10% SDS-PAGE gels.  
204 Proteins were electro-transferred to Hybond C membranes (GE Healthcare) with a  
205 Trans-Blot apparatus (BioRad), visualized by reversible staining with MemCode (Pierce)  
206 and the images captured in a GS-800 scanning densitometer (BioRad). Primary anti-  
207 desmin mouse antibody (Sigma Chemical Co. - D-1033) was used in a 1:2,000 dilution  
208 and bound antibodies were revealed using a peroxidase-coupled anti-mouse IgG  
209 antibody (Pierce 31430, 1:5,000 dilutions). Blots were visualized with the SuperSignal  
210 West Pico chemiluminescence substrate (Pierce 34080) and images captured as  
211 described above. For quantitative analysis, Western blot signals were normalized  
212 based on the total proteins detected per lane in the corresponding MemCode stained  
213 membrane using the QuantityOne software (BioRad).

214

## 215 **Statistical analysis**

216 Student's *t* -test was used to determine the significance of differences between  
217 means in Western blot, RT-PCR and quantitative assays. A *p* value  $\leq 0.05$  was  
218 considered significant.

219

## 220 **Results**

### 221 **Quantitative analysis of infectivity of *T.gondii* in SkMC**

222 The quantitative data showed that after 2h of *T. gondii*-SkMC interaction 79% of  
223 the cells had internalized parasites, and after 24h more than of 90% these cells were  
224 infected (Fig. 1A). The evaluation of the number of internalized parasites showed that

225 after 2h of the interaction, SkMC contained around 3.5 parasites per infected cell and  
226 7.3 after 24h of interaction (Fig. 1B).

227

## 228 **Cytoarchitecture of skeletal muscle cell during infection with *Toxoplasma gondii*,** 229 ***in vitro***

### 230 **Actin**

231 In the normal SKMC (non infected cells), the actin protein was visualized in the  
232 fibrils, distributed preferentially along the main axis of the cell, filling the cytoplasm  
233 evenly with a slight concentration at the edges and ends of both myoblasts and  
234 myotubes (Fig. 2A - inset). After 3h of infection with tachyzoites of *T. gondii*, SkMC  
235 revealed no changes in the distribution of actin filaments (Fig. 2B). Mature myotubes  
236 with more than 20 nuclei in primary cultures of SkMC still showed the parallel  
237 distribution of actin throughout the cell during the fusion process, in addition no change  
238 was observed in the distribution of these filaments at the myoblast contact points (Fig.  
239 2C). However, after 24h of infection these cultures revealed a decrease or absence of  
240 actin at the infection site accompanied by its disorganization, evidenced by an increase  
241 in the distances between the actin microfilaments that had lost their parallel organization  
242 (Fig. 2D).

243

### 244 **Tubulin**

245 The antibody anti- $\beta$ -tubulin was used to analyze the distribution of tubulin that is a  
246 protein constituent of microtubules. Indirect immunofluorescence revealed the presence  
247 of microtubules with a filamentous aspect distributed along the SkMC; however it was  
248 not possible to observe the centrosome, also known as the microtubule organizing  
249 center (MTOC), which nucleate microtubules. The results here corroborate the idea that

250 the centrosome is eliminated during maturation and some microtubules form linear  
251 arrays parallel to the long axis of the cell to increase the stability of SkMC, as previously  
252 described by Gundersen et al. (1989) (Fig. 3A). After 3h (Figs. 3B-C and 3D-E) and  
253 24h (Fig. 4A-C) of *T. gondii*-SkMC interaction, infected cultures acquired a new layout of  
254 microtubules surrounding the parasitophorous vacuole (PV).

255

## 256 **Myosin**

257 Antibody monoclonal anti-skeletal muscle myosin was used to study the  
258 distribution of myosin in SkMC. The protein myosin in SkMC up to 5 days of culture  
259 showed an intense myogenesis, as shown in Figure 5A. During the differentiation the  
260 SkMC sarcoplasm presented myofibrils (cylindrical and parallel structures) formed by  
261 repeating contractile units - the sarcomeres, which conferred a striated pattern for  
262 SkMC (Sanger et al., 2010) (Fig. 5A).

263 After 3h of *T. gondii*-SkMC interaction the distribution pattern of myosin was  
264 modified in the infected mature myotubes. There was: (i) a lower marking to myosin in  
265 sarcoplasm; (ii) absence of the striated profile of myofibrils and, (iii) a higher  
266 concentration of this protein on the edges and at the ends of SkMC and below the  
267 sarcolemma (Fig. 5B). After 24h of infection three sequential sections of the same cell,  
268 analyzed by confocal microscopy, indicated significant changes in myosin distribution:  
269 (i) filaments of myosin surrounding the PVs; (ii) accumulation of myosin at different  
270 points of the cell and, (iii) disorganization of myofibrils at the infection site due to the  
271 massive presence of parasites (Fig. 6A, B and C).

272

## 273 **Desmin**

274 Desmin, a muscle-specific protein constituent of intermediate filaments (IFs), was  
275 revealed by indirect immunofluorescence in myoblasts, in young and mature myotubes  
276 and in myofibers during the fusion process (Figs. 7A - inset and B). Myoblasts present  
277 in culture (Fig. 7A - inset), and in myotubes, during the fusion process or not, revealed a  
278 higher concentration of desmin in the extremities as filamentous structures longitudinally  
279 oriented (Fig. 7B). Mature myofibers showed desmin as a dense network of striated  
280 filaments (Fig. 7C-D).

281 Cultures infected with tachyzoites of *T. gondii* and fixed in the first 3h of interaction  
282 showed the highest concentration of desmin at the ends of the cells, with diffuse  
283 staining in the cytoplasm. Infected myotubes had lower labeling for desmin protein  
284 compared to uninfected myotubes, whereas in infected myoblasts this labeling  
285 disappeared completely (Fig. 7E-F). After 12h of interaction myotubes containing  
286 several parasites displayed a large reduction in desmin at the infection site and only low  
287 markings on the extremities of these parasitized cells remained, while infected  
288 myoblasts were negative for desmin (Fig. 7G-H). The analysis of these cultures after  
289 24h of interaction with *T. gondii* showed a significant decrease in desmin in infected  
290 SkMC. A comparative study of the Figures 8A-B (control) and 8C-D (after 24h of *T.*  
291 *gondii*-SkMC interaction) for both groups of images (phase contrast and fluorescence  
292 microscopy) clearly shows a decrease in the expression of desmin in the cells  
293 containing parasites. Cultures infected for 48h with *T. gondii*, showed zero expression of  
294 desmin in the parasitized cells (Fig. 8E-F).

295

#### 296 **RT-PCR analysis of desmin mRNA in *T. gondii*-infected SkMC**

297 Desmin gene expression in SkMC experimentally infected with *T. gondii* was  
298 analyzed by RT-PCR. The myogenic phenotype of all SkMC samples was checked, and

299 subsequently the expression of mRNA desmin was detected in all six samples. The  
300 times of the *T. gondii*-SkMC interactions with their respective controls were 3, 12 and  
301 24h (Fig. 9A). Semi-quantitative RT-PCR was normalized by GAPDH and considerable  
302 amounts of mRNA for desmin were detected in the samples, control and *T. gondii*-  
303 infected SkMC (Fig. 9B). The results here show that no significant change was  
304 observed in the expression profile of desmin mRNA in *T. gondii*-infected SkMC after 3,  
305 12 and 24h of interaction.

306

### 307 **Analysis of the expression of desmin by Western blot in *T. gondii*-infected SkMC**

308 In order to analyze the expression of desmin, during the first hours and after 24h of  
309 *T. gondii*-SkMC interaction, total proteins were extracted and processed for detection by  
310 Western blot. For quantitative analysis, Western blot signals were normalized based on  
311 the total proteins detected per lane in the corresponding MemCode stained membrane  
312 using the QuantityOne software (BioRad).

313 In the course of infection until 24h, Western blot results showed lower desmin  
314 expression (71%) after 3h of interaction when compared to control (a 4-day-old culture)  
315 as shown in Fig. 10A and B. After 24h of interaction, a 70% reduction in desmin  
316 synthesis in relation to control was observed, corresponding to a 5-day-old culture (Fig.  
317 10A and B).

318

### 319 **Discussion**

320 This work investigated the alteration of the cytoskeleton elements of SkMC during  
321 infection with *T. gondii* tachyzoites showing that changes in the cytoarchitecture of the  
322 muscle cells were more pronounced during parasite replication.

323 The quantitative study was conducted in order to discuss the actual toxoplasma  
324 participation in modulation of SkMC cytoskeleton. After the establishment of  
325 myogenesis, SkMC cultures were infected with *T. gondii* in a 5:1 ratio, respectively. Our  
326 results showed that after 2h of interaction 80% of cells were infected and after 24h,  
327 more than 90% of SkMC had internalized at least one parasite. Regarding the number  
328 of parasites per cell, after 2h the average was 3.5 and with 24h was 7.3 taquizoítos.  
329 With this rate of infection was possible the observation of the influence of *T. gondii* on  
330 cytoskeleton of cell muscle with the maintenance of integrity of culture.  
331 Immunofluorescence confocal microscopy detected general alterations in the  
332 organization and distribution of actin. In the first hours of *T. gondii*-SkMC interaction no  
333 changes in the arrangement of host cell actin microfilaments were observed, which  
334 reinforces the concepts already pre-established concerning the mechanisms of parasite  
335 invasion (Dobrowolski et al., 1997). After 24h of the interaction in both the myoblasts  
336 and myotubes, a fraying of actin microfilaments with the egress of some parasites from  
337 the SkMC was observed. Previous studies using cardiac muscle cells infected by *T.*  
338 *cruzi* showed that the distribution pattern of actin was altered highly with the egress of  
339 the parasites (Pereira et al., 1993). Also a regulation of calcium levels in the host cell  
340 during the egress of *T. gondii* has been described (Hoff & Carruthers, 2002;  
341 Arrizabalaga e Boothroyd, 2004; Caldas et al., 2010). This regulation may involve the  
342 activation of proteolytic systems such as the calpain system that may act in the  
343 phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) that is  
344 calpain-dependent, altering its ability to bind to the actin network, and promoting the  
345 disruption of stress fibers (Hartwig et al., 1992; Bubb et al., 1999; Dedieu et al., 2004).  
346 Here we speculate that this event could be one of the factors related to the

347 disorganization of actin filaments, and the massive presence of toxoplasma in SkMC  
348 can be regulating the host's calcium levels.

349       Recently, Sweeney et al (2010) described the involvement of microtubules during  
350 the *T. gondii* cellular invasion process. In the early stages of the infection, in the  
351 experiments carried out here, a remodeling of these filaments was observed without  
352 their breakage or degradation. Unlike what was observed for actin microfilaments, the  
353 microtubules remained abundant and evenly distributed in the great majority of the  
354 normal and infected cells. Previous studies by our group have demonstrated the  
355 presence of microtubules surrounding the parasitophorous vacuole after 18h of the *T.*  
356 *gondii*-SkMC interaction (Andrade et al., 2001). Based on this observation, the kinetics  
357 of microtubule participation in the initial events and during the intracellular fate of *T.*  
358 *gondii* in SkMC was evaluated. Our data revealed the presence of tubulin around the  
359 PV at 3h of infection and after 24h of interaction a new and more organized  
360 arrangement of the microtubules around the PV was observed, confirming the previous  
361 observations of Andrade et al (2001). Studies show that changes in growth of PV are  
362 dynamic and that a vacuole can increase its surface area four times and its volume  
363 eight times within the first 24h of infection (Sinai, 2008). We believe that the  
364 participation of microtubules around the PV in *T. gondii*-SkMC infection is related not  
365 only to the acquisition of nutrients by the parasite (Coppens et al., 2006), but also to act  
366 as a form of structural stabilization of the parasitophorous vacuole membrane. Besides,  
367 the microtubules appear contribute in new position of organelles, as sarcoplasmic  
368 reticulum and mitochondria in infected SkMC surrounding the PV and during the  
369 replication of the parasite serve to establish this niche (Andrade et al., 2001; Melo et  
370 al., 2001; Sinai, 2008).

371 The myofibrillogenesis process with a progressive distribution of myosin forming  
372 sarcomere A-bands confers a striated profile to SkMC (Sanger et al., 2010). On the  
373 basis of our results, we believe that infection by *T. gondii* may interfere with this  
374 myofibrillogenesis process. After 24h of *T. gondii*-SkMC interaction, the massive  
375 presence of parasites leads to a total disorganization of the myofibrils, apparently some  
376 are pushed in the direction of the sarcolemma, and others are seen agglomerated and  
377 surrounding the PVs. Moreover, the presence of the myosin around the PVs, leads us to  
378 believe that myosin can be recruited by toxoplasma already in the early stages of  
379 infection, similar to what happens to the microtubule during the *T. gondii*-SkMC  
380 interaction. As described by Pizon et al (2005), the microtubules appear to recruit  
381 adduce myosin during the formation and alignment of sarcomeres. Thus, we suggest  
382 that the recruitment of microtubules by *T. gondii* can also be regulating myosin during  
383 the process of myofibrillogenesis. Therefore during the course of infection with intense  
384 multiplication and movement leading to the subsequent egress of *T. gondii*, the  
385 reconstitution of myofibrils would be affected by a disorganized assembly of proteins  
386 involved in this process.

387 Structural disorders in myofibrils have been related to the development of  
388 myopathies, as for example, the desminopathies (Schröder and Schoser, 2009). In the  
389 present study, confocal microscopy detected general alterations in the organization and  
390 distribution of desmin in *T. gondii*-infected SkMC. An unexpected result obtained was  
391 the reduced labeling of desmin for interaction times ranging from 3 to 24h.  
392 Immunoblotting analysis showed a reduction of 71% and 70% in the desmin expression  
393 for these times, respectively. From these data we concluded that the downregulation of  
394 desmin in *T. gondii*-infected SkMC observed in all our experiments, was due to protein  
395 degradation since we did not observe significant changes in the synthesis of desmin



396 mRNA analyzed by PCR. The reorganization of IFs by *Toxoplasma* has been shown in  
397 other cellular models but without any decrease in the expression of proteins that  
398 constitutes these IFs (Laliberté and Carruthers, 2008). Our results for desmin as seen  
399 by both confocal and immunoblotting analysis showed a significant decrease of this  
400 protein during its infection with *T. gondii* already in the first hours of interaction. Recent  
401 studies show the involvement of desmin in the integrity of cells and the alignment of  
402 their nuclei, by stable connection to other molecules on its surface as well as the  
403 sarcolemma (Mermelstein et al., 2006; Schröder and Schoser, 2009). In this way, the  
404 lack of alignment of the nuclei observed during the analysis of infected cells could be  
405 explained by decreased expression of desmin as demonstrated here by Western blot.  
406 We believe that this degradation of desmin can be directly linked to the sensitivity of this  
407 protein and to the action of the proteolytic systems of the host cell as proposed by Goll  
408 et al. (2003). However, the possible changes induced by *T. gondii* in SkMC leading to  
409 the activation of these proteolytic systems have yet to be investigated.

410       There is a close relationship between the components of the cytoskeleton of SkMC  
411 during myofibrillogenesis (Costa et al., 2004; Sanger et al., 2010), and what we are  
412 discussing here is that the degradation of the protein desmin may be favoring the  
413 consequent disorganization of actin and thereby assisting the new layout of  
414 microtubules and myosin in cells.

415       This phenomenon among others, could explain the morphological changes  
416 undergone by SkMC after interaction with the toxoplasma, as described in the present  
417 work. Experiments using desmin-null mice showed disorders in muscle cells and on the  
418 cytoarchitecture due to a lack of myofibril anchorage to the sarcolemma (Li et al., 1997;  
419 Capetanaki et al., 2002; Shah et al., 2004; Schröder and Schoser, 2009). Thus, we  
420 hypothesized that the degradation of desmin, together with changes in other

421 cytoskeletal proteins, facilitates the lytic cycle of *T. gondii* and its displacement within  
422 the SkMC. The main changes in the cytoarchitecture of SkMC occurred over the course  
423 of infection by *T. gondii*, and coincided with the active replication and egress of the  
424 parasites. These data suggest that *T. gondii* has a strategy to break the physical  
425 barriers of the cytosol and the parasitophorous vacuole and host cell membranes in  
426 order to reach the extracellular environment.

427 In conclusion, the data presented here shows evidence of changes in the  
428 cytoarchitecture of SkMC induced by *T. gondii* infection. We suggest that the parasite  
429 may be manipulating host signaling pathways by activating their proteolytic systems.  
430 This mechanism would act to degrade primarily desmin, with consequent disruption of  
431 actin microfilaments and remodeling of microtubules and myosin. The degradation of  
432 desmin viewed by immunofluorescence assays and demonstrated by biochemical  
433 approaches facilitates the rearrangement of microtubules, myosin filaments and the  
434 displacement of the parasite within the SkMC during its lytic cycle.

435

#### 436 **Acknowledgments**

437 The authors thank Carlos Alberto Bizarro Rodrigues from Farmanguinhos/Fiocruz  
438 for producing the interferential microscopy images and Pedro Paulo Manso and Dr.  
439 Marcelo Pelajo from PDTIS-Fiocruz for their work with the confocal microscopy  
440 Platform. We are grateful to Sandra Maria de Oliveira Souza and Priscila Lemos for  
441 technical assistance and to David Straker for the English revision. This work was  
442 supported with grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
443 Tecnológico (CNPq), Edital Universal MCT/CNPq nº 014/2008, Fundação Carlos  
444 Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ),  
445 Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Fundação Oswaldo Cruz (Programa

446 Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES IV), Pronex - Programa de Apoio  
447 a Núcleos de Excelência – CNPq/FAPERJ and Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

448

#### 449 **References**

450 Andrade, E.F., Stumbo, A.C., Monteiro-Lea, L.H., Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2001. Do  
451 microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in  
452 skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? J Submicrosc  
453 Cytol. Pathol. 33, 337–341.

454 Arrizabalaga, G., Boothroyd, J.C., 2004. Role of calcium during *Toxoplasma gondii*  
455 invasion and egress. Int. J. Parasitol. 34, 361–368.

456 Barbosa, H.S., Ferreira-Silva, M.F., Guimarães, E.V., Carvalho, L., Rodrigues, R.M., 2005.  
457 Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear  
458 localization. J. Parasitol. 91, 182–184.

459 Barbosa, H.S., Pereira, M.C.S., Meirelles, M.N.L., 2000. Protocolos de culturas  
460 primarias. In: Araujo-Jorge, T., de Castro, S.L., Doença de Chagas (Eds.), Manual  
461 para experimentac, ão animal. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 297–313

462 Bubb, M.R., Lenox, R.H., Edison, A.S., 1999. Phosphorylation-dependent conformational  
463 changes induce a switch in the actin-binding function of MARCKS. J. Biol. Chem. 274,  
464 36472–36478.

465 Bugnard, E., Zaal, K.J., Ralston, E., 2005. Reorganization of microtubule nucleation during  
466 muscle differentiation. Cell Motil. Cytoskeleton 60, 1–13.

467 Caldas, L.A., de Souza, W., Attias, M., 2010. Microscopic analysis of calcium ionophore  
468 activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. Vet Parasitol. 20, 8–18.

469 Capetanaki, Y., 2002. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial  
470 behavior and function. Trends Cardiovasc. Med. 12, 339–348.

- 471 Charge, S.B., Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle  
472 regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209–238.
- 473 Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C., 2002. Striated muscle  
474 cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18,  
475 637–706.
- 476 Collins, J.F., Pawloski-Dahm, C., Davis, M.G., Ball, N., Dorn, G.W., Walsh, R.A., 1996. The  
477 role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J.*  
478 *Mol. Cell Cardiol.* 28, 1435–1443.
- 479 Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA., 2006.  
480 *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar  
481 space. *Cell* 121, 261–274.
- 482 Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., Mermelstein, C.S., 2004. Desmin:  
483 molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament  
484 protein. *Braz J Med Biol Res.* 37, 1819–1830.
- 485 Cuturic, M., Hayat, G.R., Vogler, C.A., Velasques, A., 1997. Toxoplasmic polymyositis  
486 revisited: case report and review of literature. *Neuromuscul Disord.* 7, 390–396.
- 487 Dedieu, S., Poussard, S., Mazeret, G., Grise, F., Dargelos, E., Cottin, P., Brustis, J.J.,  
488 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell  
489 attachment and cytoskeletal organization. *Exp. Cell Res.* 292, 187–200.
- 490 Dobrowolski, J., Sibley, L.D., 1997. The role of the cytoskeleton in host cell invasion by  
491 *Toxoplasma gondii*. *Behring. Inst. Mitt.* 99, 90–96.
- 492 Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii*  
493 tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue  
494 cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267–299.
- 495 Ferreira da Silva, M.da F., Barbosa, H.S., Groß, U., Lüder, C.G.K., 2008. Stress-related  
496 and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. BioSyst.* 4, 824–  
497 834.

- 498 Ferreira-da-Silva, M.F., Rodrigues, R.M., Andrade, E.F., Carvalho, L., Groß, U., Lüder, C.  
499 G., Barbosa, H. S., 2009a. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent  
500 *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation.  
501 Mem. Inst. Oswaldo Cruz 140, 196–200.
- 502 Ferreira-da-Silva, M.F., Takács, A.C., Barbosa, H.S., Gross, U., and Lüder, C.G., 2009b.  
503 Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-  
504 bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. Int. J. Med. Microbiol. 299, 281-  
505 288.
- 506 Gherardi, R., Baudrimont, M., Lionnet, F., Salord, J.M., Duvivier, C., Michon, C., Wolff, M.,  
507 Marche, C., 1992. Skeletal muscle toxoplasmosis in patients with acquired  
508 immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study. Ann. Neurol. 32, 535–  
509 542.
- 510 Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. Physiol.  
511 Rev. 83, 731–801.
- 512 Guimarães, E.V., Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2009. Interaction and cystogenesis of  
513 *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 140,  
514 170–174.
- 515 Guimarães, E.V., de Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2008. Primary culture of skeletal muscle  
516 cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. J. Parasitol. 94, 72–  
517 83.
- 518 Gundersen, G.G., Khawaja, S., Bulinski, J.C., 1989. Generation of a stable,  
519 posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic  
520 differentiation. J. Cell Biol. 109, 2275–2288.
- 521 Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C., Aderem, A., 1992.  
522 MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C, and  
523 calcium-calmodulin. Nature 356, 618–622.

- 524 Hassene, A., Vital, A., Anghel, A., Guez, S., Series, C., 2008. Acute acquired  
525 toxoplasmosis presenting as polymyositis and chorioretinitis in immunocompetent  
526 patient. *Joint Bone Spine* 75, 603–605.
- 527 Hijikata, T., Murakami, T., Ishikawa, H., Yorifuji, H., 2003. Plectin tethers desmin  
528 intermediate filaments onto subsarcolemmal dense plaques containing dystrophin and  
529 vinculin. *Histochem. Cell Biol.* 119, 109–123.
- 530 Hoff, E.F., Carruthers, V.B., 2002. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion?  
531 *Trends Parasitol.* 18, 251–255.
- 532 Kokta, T.A., Dodson, M.V., Gertler, A., Hill, R.A., 2004. Intercellular signaling between  
533 adipose tissue and muscle tissue. *Domest Anim. Endocrinol.* 27, 303–331.
- 534 Laliberté, J., Carruthers, V.B., 2008. Host cell manipulation by the human pathogen  
535 *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1900–1915.
- 536 Lazarides, E., 1980. Desmin and intermediate filaments in muscle cells. *Results Probl Cell*  
537 *Differ.* 11, 124–131.
- 538 Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler-Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L.E., Babinet,  
539 C., Paulin, D., 1997. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of  
540 myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal  
541 muscle. *J. Cell Biol.* 139, 129–144.
- 542 Magalhães, K.G., Passos, L.K., Carvalho-Odos, S., 2004. Detection of *Lymnaea columella*  
543 infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99,  
544 421– 424.
- 545 Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W., 2001. Behaviour of microtubules in cells infected with  
546 *Toxoplasma gondii*. *Biocell* 25, 53–59.
- 547 Mermelstein, C.S., Andrade, L.R., Portilho, D.M., Costa, M.L., 2006. Desmin filaments are  
548 stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts. *Cell Tissue Res.*  
549 323, 351–357.

- 550 Nagineni, C.N., Detrick, B., Hooks, J.J., 2000. *Toxoplasma gondii* infection induces gene  
551 expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony  
552 stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment  
553 epithelial cells. *Infect Immun.* 68, 407–410.
- 554 Nishikawa, Y., Xuenan, X., Makala, L., Vielemeyer, O., Joiner, K.A., Nagasawa, H., 2003.,  
555 Characterisation of *Toxoplasma gondii* engineered to express mouse interferon-  
556 gamma. *Int. J. Parasitol.* 33, 1525–1535.
- 557 Pereira, M.C., Costa, M., Chagas Filho, C., de Meirelles, M.N., 1993. Myofibrillar  
558 breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by  
559 *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J. Submicrosc. Cytol.*  
560 *Pathol.* 25, 559–569.
- 561 Pizon, V., Gerbal, F., Diaz, C.C., Karsenti, E., 2005. Microtubule-dependent transport and  
562 organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J.* 24,  
563 3781–3792.
- 564 Sanger, J.W., Chowrashi, P., Shaner, N.C., Spalthoff, S., Wang, J., Freeman, N.L., Sanger,  
565 J.M., 2002. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 403,  
566 153–162.
- 567 Sanger, J.W., Kang, S., Siebrands, C.C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A.L.,  
568 Sanger, J.M., 2005. How to build a myofibril. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26, 343–354.
- 569 Sanger, J.W., Wang, J., Fan, Y., White, J., Sanger, J.M., 2010. Assembly and dynamics of  
570 myofibrils. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 858606.
- 571 Schröder, R., Schoser, B., 2009. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological  
572 guide. *Brain Pathol.* 19, 483–492.
- 573 Shah, S.B., Davis, J., Weisleder, N., Kostavassili, I., McCulloch, A.D., Ralston, E.,  
574 Capetanaki, Y., Lieber, R.L., 2004. Structural and functional roles of desmin in mouse  
575 skeletal muscle during passive deformation. *Biophys. J.* 86, 2993–3008.
- 576 Sinai, A.P., 2008. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous  
577 vacuole membrane. *Subcell Biochem.* 47, 155–164.

- 578 Sweeney, K.R., Morrissette, N.S., LaChapelle, S., Blader, I.J., 2010. Host cell invasion by  
579 *Toxoplasma gondii* is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton.  
580 Eukaryot. Cell 9, 1680–1689.
- 581 Taniwaki NN, Andreoli WK, Calabrese KS, da Silva S, Mortara RA., 2005. Disruption of  
582 myofibrillar proteins in cardiac muscle of *Calomys callosus* chronically infected with  
583 *Trypanosoma cruzi* and treated with immunosuppressive agent. Parasitol. Res. 97,  
584 323–331.
- 585 Tassin, A.M., Paintrand, M., Berger, E.G, Bornens, M., 1985. The Golgi apparatus remains  
586 associated with microtubule organizing centers during myogenesis. J. Cell Biol. 101,  
587 630–638.
- 588 Taubert, A., Krüll, M., Zahner, H., Hermosilla, C., 2006a. *Toxoplasma gondii* and *Neospora*  
589 *caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule  
590 gene transcription and subsequent PMN adhesion. Vet. Immunol. Immunopathol. 15,  
591 272–283.
- 592 Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2006b. Dynamics of transcription of  
593 immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian  
594 parasites. Vet. Parasitol. 142, 214–222.
- 595 Tenter, A.M., 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem.  
596 Inst. Oswaldo Cruz 104, 364–369.

597

## 598 **Legends**

599 **Fig. 1.** Quantitative analysis of infectivity of *T.gondii* in SkMC. (A) Percentage of SkMC  
600 infected after 2 and 24 h of interaction. Note after 2h interaction 79% of cells showed  
601 internalized parasites, and after 24h more than 90% of SkMC were parasitized (Fig.  
602 1A). (B) The assessment of mean number of intracellular tachyzoites in SkMC revealed  
603 3.5 parasites per cell infected after 2h and 7.3 parasites after 24h of interaction (Fig.  
604 1B).



605

606 **Fig. 2.** By confocal microscopy is showed protein actin (in red) in *T. gondii*-infected  
607 SkMC. (A) Control SkMC, actin protein (in red) located along the main axis of the cell,  
608 evenly filled throughout the cytoplasm however with a slight concentration at the edges  
609 and ends of both myoblasts and myotubes (arrows). Note actin distribution pattern in  
610 more detail in insert and nucleus, in blue. (B) SkMC infected with *Toxoplasma*. Cultures  
611 of SkMC after 3h of infection revealed no changes in the distribution of actin filaments.  
612 (C) Mature myotubes with more than 20 nuclei (in blue); notice that the SkMC actin is  
613 distributed in parallel throughout cell (arrows); no change in the profile of actin labeling  
614 is seen in the distribution of these filaments at the point of contact with myoblasts during  
615 the fusion process. (D) *T. gondii*-infected SkMC (small arrows) after 24h. Observe a  
616 decrease or absence of actin at the infection site, accompanied by the disorganization  
617 of actin filaments, revealed by the spacing between microfilaments (arrow). Bars 20 $\mu$ m  
618

619 **Fig. 3.** By confocal microscopy is seen the cytoskeleton of protein  $\beta$ -tubulin (in red), in  
620 *T. gondii*-infected SkMC. (A) Image representing the distribution of  $\beta$ -tubulin, a protein  
621 constituent of microtubules in SkMC. The filamentous characteristic profile of  
622 microtubules can be seen in myotubes and intense labeling at the periphery of the  
623 SkMC (arrows). In insert: nucleus by DAPI, in blue. (B) Image showing a myoblast after  
624 3h of infection with *T. gondii*. Note a remodeling of microtubules around three  
625 parasitophorous vacuoles (arrows). (C) Image showing the nuclei of SkMC (larger) and  
626 tachyzoites of *T. gondii* (smaller) (in blue) (small arrow). (D) Image revealing myotubes  
627 where the microtubules are arranged in parallel filament (arrowhead), without the  
628 presence of vacuoles of *T. gondii*. See just above SkMC newly infected with stronger  
629 staining for  $\beta$ -tubulin around two vacuoles (thin arrows) and loss of parallel arrangement

630 of microtubules. (E) Image showing the nuclei of SkMC (bigger) and tachyzoites of *T.*  
631 *gondii* (smaller), in blue (small arrow).

632  
633 **Fig. 4.** By confocal microscopy: sections of the same cell - cytoskeleton of  $\beta$ -tubulin  
634 protein (in red), in *T. gondii*-infected SkMC. (A) After 24h of interaction, the microtubules  
635 still maintain the new remodeled profile seen before in the early interaction. Note the  
636 presence of vacuoles surrounded by microtubules (thin arrows) showing an even more  
637 convoluted profile. (B) Image showing the nuclei of SkMC (larger) and tachyzoites of *T.*  
638 *gondii* (smaller) (thin arrows). (C) Merge image of A and B for better localization of  
639 parasites (thin arrows) in SkMC.

640  
641 **Fig. 5.** By confocal microscopy: cytoskeleton of myosin protein (in red), in *T. gondii*-  
642 infected SkMC. (A) Revelation of myosin in SkMC showing the general appearance of  
643 myogenesis *in vitro*. Note above mature myotubes with more than six nuclei (in blue)  
644 with a striated profile of myosin characterizing the success of the myofibrillogenesis  
645 (arrow). Young myotubes in the process of alignment and fusion can be seen with a  
646 small concentration of myosin near the sarcolemma (arrows), but occupying filling the  
647 sarcoplasm. (B) *T. gondii*-infected SkMC after 3h of interaction. Note the arrangement  
648 of myosin filaments with decreased staining in the innermost region of the cell and  
649 increased staining at the cell periphery.

650  
651 **Fig. 6.** Sections of the same cell by confocal microscopy: myosin in *T. gondii*-infected  
652 SkMC for 24h. (A) Images show that the myosin (in red) appears more concentrated in  
653 the sarcolemma, and their filaments are more disorganized in the central region of the  
654 SkMC (thin arrows) where the parasites are located (thick arrows). (B) Same infected

655 cell on another focal plane. Note in more details, the emergence of a new profile of  
656 myosin filaments. In this image the filaments of myosin can be seen arranged around  
657 the vacuoles (thin arrows) containing *T. gondii* (thick arrows). Nuclei of the cells and the  
658 parasites labeled with DAPI, in blue. (C) In this image, the DAPI marking of the nucleus  
659 was omitted for better observation of the new arrangement of myosin around the  
660 parasitophorous vacuoles (arrows). Bars, 20  $\mu\text{m}$

661  
662 **Fig. 7:** By interferential and confocal microscopy: cytoskeleton of desmin protein (in  
663 red), in *T. gondii*-infected SkMC. (A) Morphologic aspect of myogenesis in SkMC is  
664 observed by interferential microscopy. Note the aspect of myoblasts (arrowhead) and  
665 young myotubes (arrows). (B) By confocal microscopy in control cells the desmin (in  
666 red), a protein constituent of muscle cell IFs, is present as filamentous structures  
667 longitudinally oriented in bipolar myoblasts (insert) and myotubes. Note a stronger  
668 staining for desmin at one end of a young myotube. (C) Morphologic aspect of myofiber  
669 is observed by interferential microscopy. (D) Confocal microscopy showed a better  
670 distribution toward the cell center in the mature SkMC and longitudinally displayed as a  
671 dense network of striated filaments. (E) Myotube and myoblast recently infected with *T.*  
672 *gondii* (small arrows). (F) The same myotubes less marked for desmin in all regions of  
673 the infected cell. Note that approximately at 3h of infection one end of the myotubes  
674 remains well marked, whereas in myoblasts it has disappeared completely. (G) Image  
675 showing myoblasts and myotubes after 12h of interaction with *T. gondii* (small arrows).  
676 (H) After 12h of interaction with *T. gondii* myoblasts remain unmarked for desmin. Note  
677 that myotubes have small marks at one end and none in the rest of the parasitized cell.  
678 Bars: 20 $\mu\text{m}$

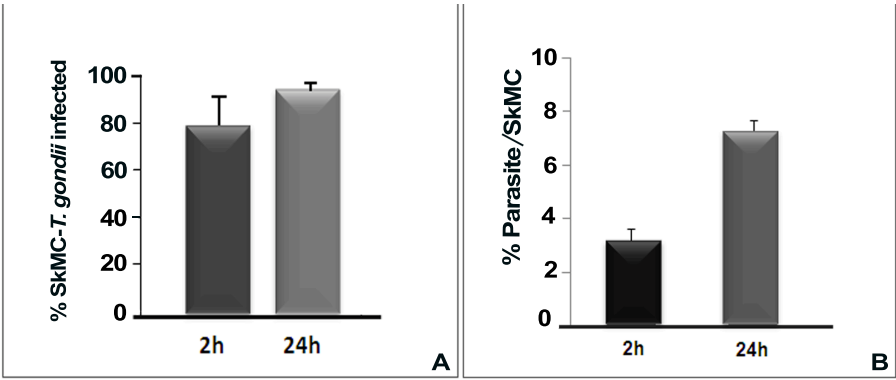
679

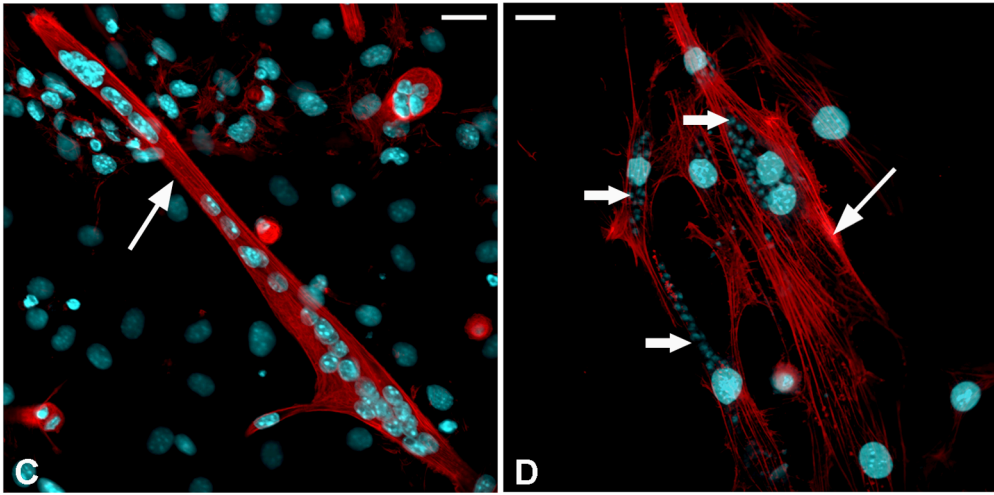
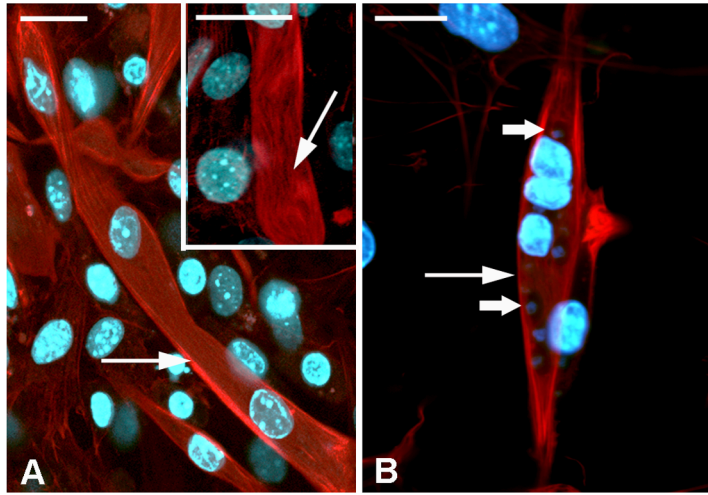
680 **Fig. 8:** By phase contrast and fluorescence microscopy: cytoskeleton of desmin  
681 protein (in red), in *T. gondii*-infected SkMC. (A) General aspect of the culture after 5  
682 days of culture, highlighting young myotubes (arrow). (B) The same culture showing  
683 markup for the protein desmin that appears a little more focused at one end of the  
684 myotubes. (C) General aspect of culture of SkMC infected with *T. gondii* after 24h  
685 (arrow). (D) Fluorescence image showing the protein desmin. Note the substantial  
686 decrease of desmin labeling in the highly infected SkMC. (E) Myotube after 48h  
687 interaction (arrows). (F). Note the absence of desmin in the myotubes that are highly  
688 infected with *T. gondii*.

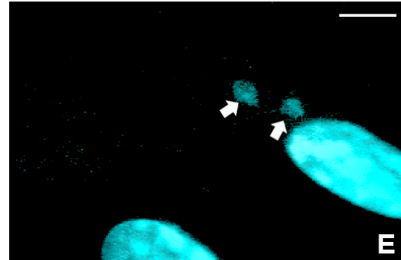
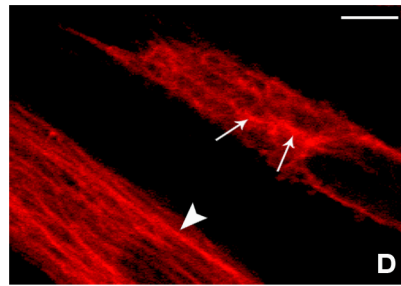
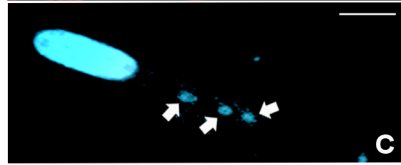
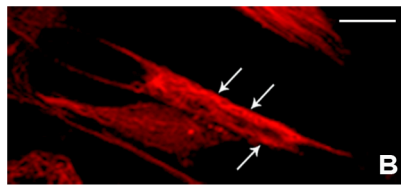
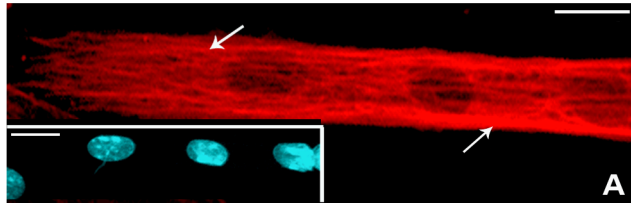
689  
690 **Fig. 9:** RT-PCR analysis of desmin mRNA in *T. gondii*-infected SkMC. (A) Desmin gene  
691 expression in *T. gondii*-infected SkMC was analyzed through RT-PCR. No statistically  
692 significant changes were found in the expression of mRNA desmin in *T. gondii*-infected  
693 SkMC after 3, 12 and 24h of interaction, when compared to their respective controls  
694 (uninfected cultures). Profile of desmin mRNA expression in SkMC experimentally  
695 infected with *T. gondii*. The arbitrary values presented in the graph are based on the  
696 densitometric analysis of the PCR gel image represented in panel B corresponding to 3,  
697 12 and 24h of infection. (B) Polyacrylamide, silver stained gels for visualization of the  
698 amplified desmin and GAPDH mRNAs (from top to bottom, respectively). Lanes 1, 3  
699 and 5 show the profiles of negative controls and lanes 2, 4 and 6 the profiles of infected  
700 cells. Student's T-test (\*)  $p \leq 0.05$ .

701  
702 **Fig. 10:** Desmin protein dosage in *T. gondii*-infected SkMC detected by Western blot  
703 analysis. (A) Regarding the presence of protein desmin, a statistically significant  
704 decrease ( $p \leq 0.05$ ) was found in *T. gondii*-infected SkMC when compared to uninfected

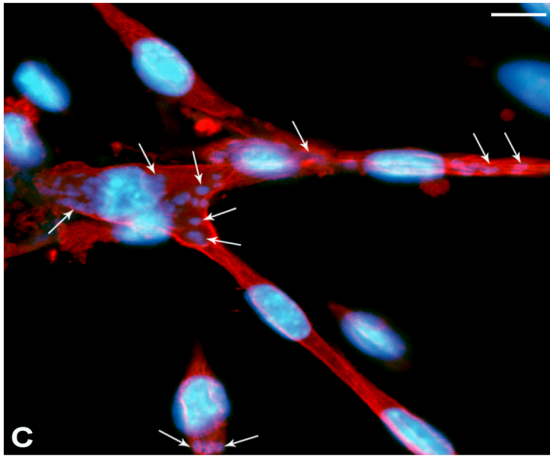
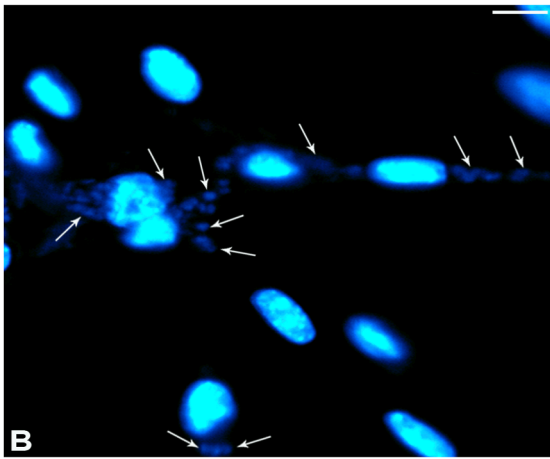
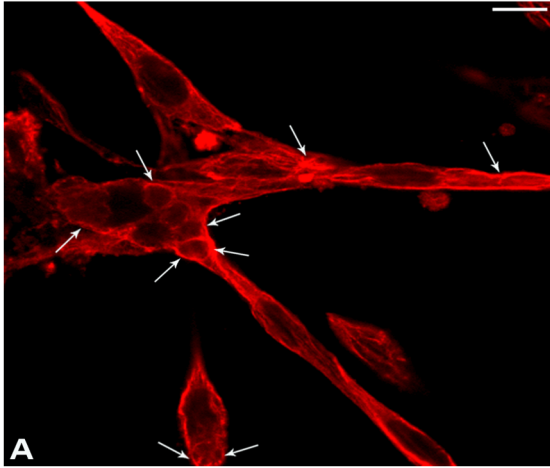
705 cultures at all times of interaction. Our results showed a reduction of 71% in desmin  
706 expression after 3h of infection in comparison to desmin levels in uninfected cultures  
707 (with a 4-day-old culture). After 24h of interaction, a similar decrease of 70% (in desmin  
708 levels) was observed in *T. gondii*-infected SkMC in comparison to 5-day-old uninfected  
709 cultures. (B) Image representing Western blot of desmin expression of uninfected  
710 cultures (C1-culture with 4-day-old and C2 - culture with 5-day-old) and *T. gondii*-  
711 infected SkMC (I1-after 3h and I2 after 24h of *T. gondii* interaction). For quantitative  
712 analysis, Western blot signals were normalized based on the total proteins detected per  
713 lane in the corresponding MemCode stained membrane using the QuantityOne software  
714 (BioRad).  
715

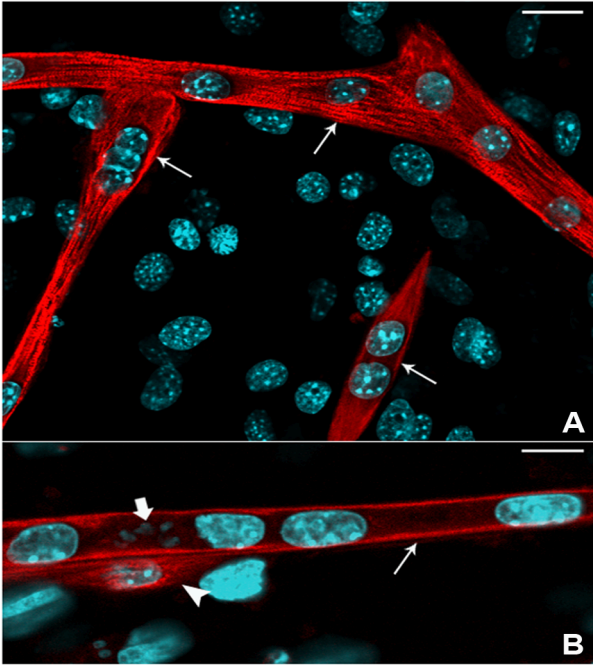


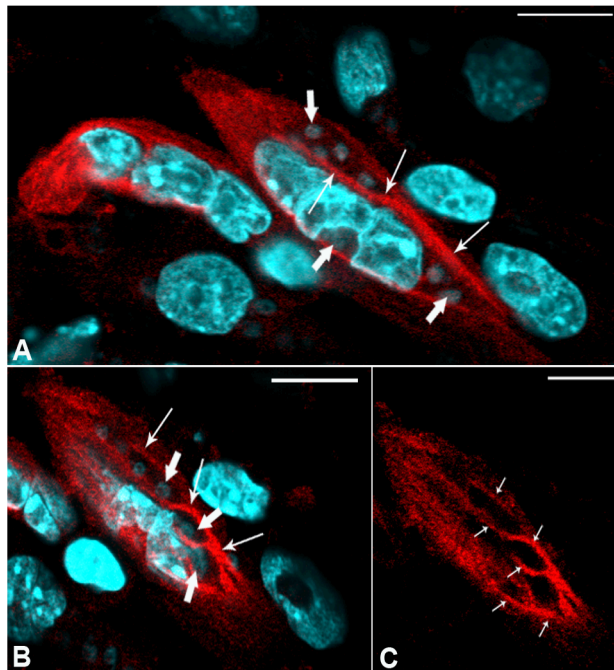


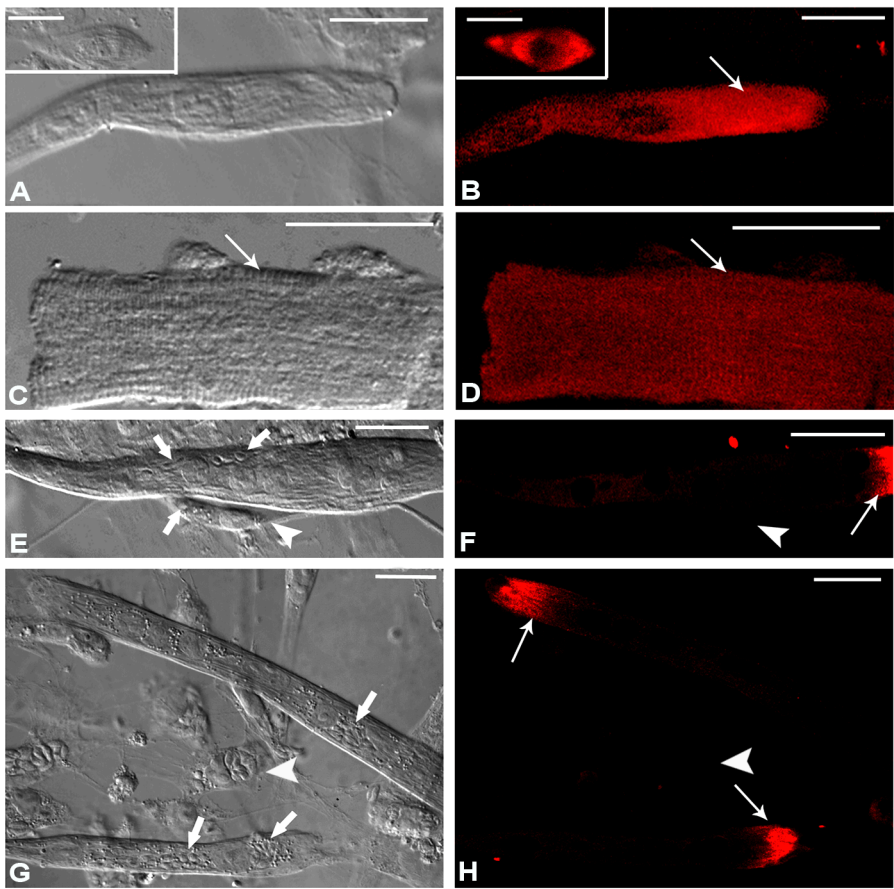


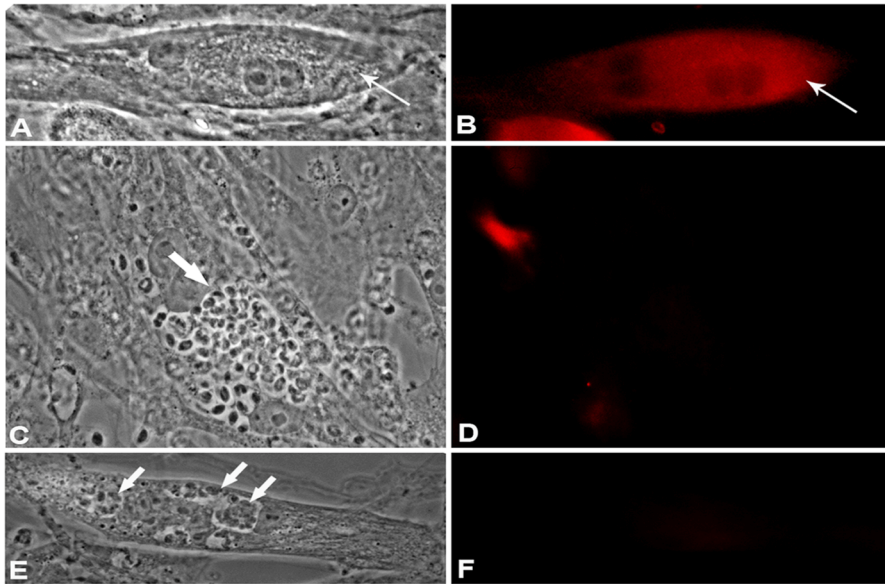


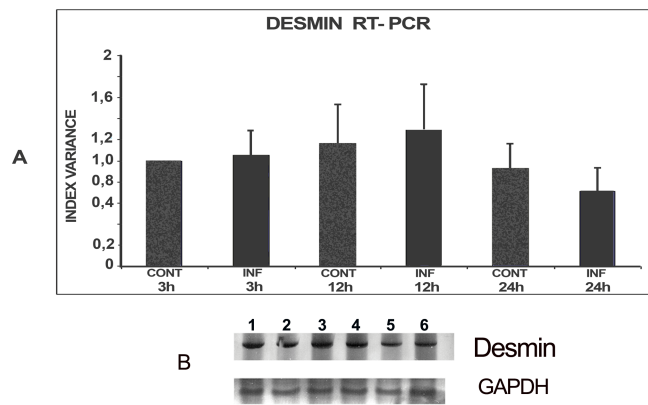




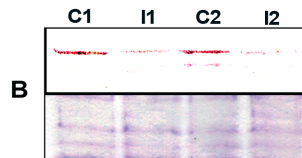
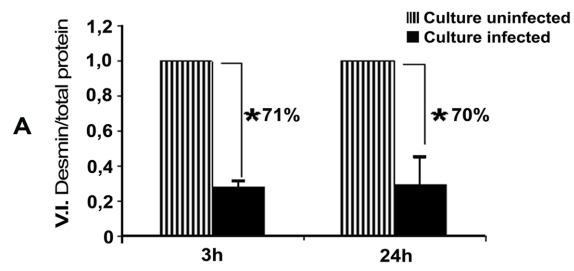








Desmin protein expression during  
SkMC-*T. gondii* interaction





**Toxoplasma gondii-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplets biogenesis and inflammatory mediator**



Journal:	<i>Traffic</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gomes, Alessandra; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Lab. Biologia Estrutural Magalhães, Kelly; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunofarmacologia Rodrigues, Renata; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Lab. Biologia Estrutural Carvalho, Laís; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Lab. Cultura de Células, Depto. Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Molinaro, Raphael; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunofarmacologia Barbosa, Helene; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Lab. Biologia Estrutural Bozza, Patrícia; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunofarmacologia
Key Words:	Toxoplasma gondii, lipid droplets , skeletal muscle cells, T. gondii-host cell interaction, Prostaglandin-E2, sarcoplasmic reticulum

SCHOLARONE™  
Manuscripts



Running headline: Lipid droplets and *T. gondii*-SkMC

## ***Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplets biogenesis and inflammatory mediator**

Alessandra F. Gomes<sup>1</sup>, Kelly G. Magalhães<sup>2</sup>, Renata M. Rodrigues<sup>1</sup>, Laís de Carvalho<sup>3</sup>, Raphael Molinaro<sup>2</sup>, Patrícia Bozza<sup>2</sup>, Helene S. Barbosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Estrutural, <sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil and <sup>3</sup>Lab. Cultura de Células, Depto. Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\*Correspondence to: Dra. Helene S. Barbosa, Lab. Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brasil, CEP 21040-361. Fax: 0055 021 22604434  
Tel: 0055 (021) 2598-4413. e-mail address: [helene@ioc.fiocruz.br](mailto:helene@ioc.fiocruz.br)

### **Summary**

**The fate of host lipid droplets (lipid bodies, LD) of skeletal muscle cells (SkMC) during their interaction with *T. gondii* was examined. The toxoplasma is able to invade vertebrate host cells and to survive within a parasitophorous vacuole (PV). We demonstrated that *T. gondii* infection of SkMC leads to a time-dependent increase in the numbers of LD. By ultrastructural cytochemistry we observed that LD interact closely with sarcoplasmic reticulum (SR) and actin cytoskeleton. Moreover, the ultrastructural analysis demonstrated that LD were in direct contact with parasitophorous vacuole membrane (PVM), within the vacuolar matrix, around and interacting directly with the membrane of the parasite, indicating that LD are recruited and deliver its content inside the PV in *T. gondii*-infected SkMC *in vitro*. Our findings showed that there is an increase of COX-2 mRNA levels in the first hour of *T. gondii*-SkMC interaction. In parallel to increased LD formation, we observed an increase of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis from 6 h up to 48 h of infection. Taken together, the close association between SR and LD with parasitophorous vacuole (PV) could represent a source of lipids as well as other nutrients for the parasite survival, and might contribute to the establishment and maintenance of chronic phase of the *T. gondii* infection in muscle cell.**

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; lipid droplets; skeletal muscle cells; *T. gondii*-host cell interaction; sarcoplasmic reticulum; Prostaglandin-E<sub>2</sub>

### **Introduction**

*Toxoplasma gondii* is an obligatory intracellular protozoan parasite that resides within a parasitophorous vacuole, which fails to fuse with host organelles from the endocytic pathway (1–5). This condition potentially deprives parasites of a large source of nutrients from the host endocytic and exocytic system (6). It is known that *T. gondii* alters the metabolism of the host cell during the invasion and replication using host-derived nutrients in their own metabolic pathways (7), and that *T. gondii* does not synthesize its own cholesterol but rely mostly in host-derived lipids for their survival. The mechanisms involved in *T. gondii* lipid acquisition are a matter of interest and are still not completely understood. Some studies show the involvement of organelles such as mitochondria and mainly the endoplasmic reticulum of host cell as suppliers of lipids, thus contributing to the increased area of vacuoles membrane during the development of the parasite (7–9). In addition, *T. gondii* infection leads to increased receptor-mediated cholesterol endocytosis by the low-density lipoprotein (LDL) pathway (4,10).

Recent studies are proposing a dynamic role for lipid droplets (LD) in the host response to intracellular pathogens. Pathogen-induced increased LD formation has been described in bacterial, viral, fungic and parasitic infections where a role for this organelle in intracellular survival and replication of pathogens has been proposed (11,12). Of note, a close association and/or the presence of host-cell LD in pathogen-containing vesicles has been detected in cells infected with *Mycobacterium tuberculosis* (13,14), *M. bovis* BCG (15,16), *M. leprae* (17), *Chlamydia* (18) as well as with protozoan parasites *Plasmodium falciparum* (19) and *Trypanosoma cruzi* (20), suggesting a role for LD in lipid trafficking during infection.

Structurally, the LD consists of a nucleus of cholesteryl esters and triglycerides surrounded by a single monolayer of phospholipids (21). The regulated formation of lipid droplets, their protein and lipid content, and their association with other intracellular organelles have established LD as specialized, inducible cytoplasmic domains that function not only in lipid storage but as organelles with roles in cell signaling and activation, regulation of lipid metabolism, membrane trafficking and control of the

synthesis and secretion of inflammatory mediators (22, 23). Accordingly, increase of LD numbers produced during infection is related with the generation of eicosanoids, where LD have been shown as sites of compartmentalization of eicosanoid-forming enzymes and domains involved in the mechanisms of enhanced eicosanoid production during inflammatory and infectious conditions (15, 20, 24–26) such as PGE<sub>2</sub>, a product of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene induction (27). Since, *T. gondii* diverts a large variety of lipid precursors from host cytoplasm and efficiently manufacture them into complex lipids to its own benefit (7, 28), we hypothesized a role for LD biogenesis during *T. gondii* infection. However, the formation of LD in *T. gondii* and both the transference of the host cell lipids to the parasite across the parasitophorous vacuole membrane (PVM) as well as the participation of SR for the maintenance of the intravacuolar parasites were not fully addressed and remain uncertain.

Most *in vitro* studies utilize cell lines and macrophages during *T. gondii*-host cell interaction assays (29). Up to the present time, little attention was given to the use of skeletal muscle cells (SkMC) as potential host cell during the study of the toxoplasmosis, despite of its well-known participation during the chronic phase of the disease (30), its relevant clinical importance in immunocompromised patients infected by the HIV virus (31) and its role in the route of parasite transmission via consumption of raw or undercooked meat containing *Toxoplasma* (32, 33). In the last years, our group has been working with primary cultures of SkMC as an experimental model for the study of toxoplasmosis *in vitro*, which opens new perspectives in this field (34–42).

In this study, we have investigated the role of LD biogenesis and interaction with PV, considering their participation in COX-2 gene expression and PGE<sub>2</sub> synthesis (27, 43, 44), during *T. gondii*-SkMC interaction for better understanding of the survival mechanisms of toxoplasma in muscle cells.

## Results

### Participation of lipid droplets during *T. gondii*-SkMC interaction

Nile Red staining revealed the presence of LD distributed throughout the whole cell cytoplasm, sometimes concentrated at the perinuclear region in SkMC as showed by both interferential and fluorescence microscopy overlay (Fig. 1A) and by confocal microscopy (Fig. 1B). After 2 h of infection with *T. gondii*, the SkMC displayed presence of LD at the sites of parasite adhesion to the host cell membrane by both interferential and confocal microscopy overlay (Fig.1C-insert). After 24 h of interaction, was possible to observe many parasites inside the PV, which was frequently surrounded by several LD (Fig. 1D).

### *T. gondii* infection triggers biogenesis of lipid droplets within muscle cells

In order, to perform a quantitative analysis of the modulation of LD biogenesis in SkMC with *T. gondii*, we used two different lipid markers: osmium (OsO<sub>4</sub>) or BODIPY. Our results demonstrated a remarkable

increase of LD biogenesis and its recruitment in *T. gondii*-infected SkMC as showed by both interferential (Fig. 2A and C) and confocal microscopy (Fig. 2B and D). After 6 h of interaction with *T. gondii*, in both myoblasts and myotubes multinucleate, we observed an increase of LD number as showed by interferential (Fig. 2C) and confocal microscopy (Fig. 2D). In SkMC, after five and six day of culture, no change was observed in the distribution and intensity of the labeling for the LD (data not shown). However, it was possible to observe a significant time-dependent increase in LD formation during 24 h (Fig. 3A and B) and 48 h (Fig. 3C and D) of *T. gondii*-SkMC interaction. At all times of interaction we observed an increase of LD number only in SkMC parasitized.

### LD and endoplasmic reticulum interaction in *T. gondii* infection

To better understand the results observed by fluorescence analysis we also investigated the involvement of LD by electron microscopy. The ultrastructural cytochemistry of SkMC using the potassium iodide technique revealed the presence of tubular structures with the eletrondense label distributed over the whole cytoplasm and also in the nuclear envelope (Fig. 4A). After 4 h of parasite-SkMC interaction it was noted that the reaction product was localized in structures resembling profiles of sarcoplasmic reticulum (SR), which surrounded the PVM, dispersed in the host cell cytoplasm and locate around the nucleus, as well as in the inner membrane complex of the parasite (Fig. 4B). After parasite-host 24 h of cell interaction, several darkened LD could be seen in close contact with PV, as revealed by imidazole technique (Fig. 4C). Small precipitation of the reaction product could also be observed inside the PV and in association with the vacuolar membrane (Fig. 4C). SkMC after 24 h of parasite-host cell interaction, cells containing two or more parasites showed reaction product for KI surrounding the nucleus of SkMC and in vesicles inside the vacuole containing *T. gondii* (Fig. 4D).

### *T. gondii* recruits LD in SKMC

The ultrastructural analysis after 2 h of *T. gondii*-SkMC interaction showed the presence of a typical parasitophorous vacuole membrane (PVM) surrounding the parasites. We noted the presence of low eletrondense cytoplasmatic structures bound not by a classic bilayer membrane but rather by an outer monolayer of phospholipids, which is a characteristic of lipid droplets (LD). PVM were closely associated to the LD (Fig. 5). Besides the intimate interaction between the LD and the PVM (Fig. 5A and inset), after 24 h we also noted some LD simultaneously associated to two different PV (Fig. 5B), like a bridge connecting them. Moreover, it was possible to observe a close contact between LD and the membrane of the parasite and its integration within the matrix of the vacuole (Fig. 6).

### *T. gondii* infection induces eicosanoid generation in muscle cells

Lipid droplets are stores of the eicosanoid precursor arachidonic acid in different leukocyte

subsets, including eosinophils, neutrophils, and monocytes, and contain eicosanoid-forming enzymes (15, 26). In this way, we investigated whether increased numbers of lipid droplets would lead to enhanced PGE<sub>2</sub> production in *T. gondii*-infected SkMC. The quantitative analysis of our experiments showed that during myogenesis of SkMC, the number of LD remained constant, but there was a significant time-dependent increase of these structures after 6, 24 and 48 h of interaction with Toxoplasma (Fig. 6 B and 7 A). The PGE<sub>2</sub> levels measured directly in the supernatant from noninfected and infected muscle cells culture with *T. gondii* after 6, 24 and 48 h of interaction by enzyme-linked immunoassay showed a significant time-dependent increase in PGE<sub>2</sub> generation following 6 h up to 48 h, that parallel and positive correlated with LD formation in *T. gondii*-infected muscle cells but not in uninfected cells (Fig. 7 B). *T. gondii* infection also triggered a time-dependent increase of COX-2 expression (Fig. 7 C).

### Discussion

It is known that *T. gondii* mobilizes lipid resources from the host cells during the invasion and its intracellular cycle (7), and although the parasite does not synthesize its own cholesterol it has evolved strategies to divert host cell lipid metabolism to favour its survival (5, 10). Our results demonstrated a cellular response by SkMC in presence of *T. gondii*, involving a rapid formation of LD. These LD could be identified by light, fluorescence and electron microscopy using specific staining (45, 46). Initially using the fluorescent dye Nile Red, was possible to observe the modulation of LD within the first hour of *T. gondii*-SkMC interaction. It was observed the presence of marking next to the parasite, and at 24 h around the PV.

Our quantitative data showed that *T. gondii* infection triggers biogenesis of LD within muscle cells. The analysis by light and fluorescence microscopy of *T. gondii*-infected SkMC stained with osmium tetroxide or BODIPY, clearly showed an increase in the number of LD after 6, 24 and 48 h of the interaction. We suggest that Toxoplasma may be interfering with the lipidic metabolism of the host cell stimulating its synthesis. Previous studies show the sequestering of some phospholipids by Toxoplasma infection during the host cell to construct more complex lipids (7, 47). In our experiments was observed that in *T. gondii*-infected SkMC occurs significant increase in the production of the LD in all times of interaction: 6, 24 and 48 h. It is known that muscle cells have the main phospholipids present in LD, representing an important role in the regulation of cell cycle, migration and myogenesis by activation of proteolytic systems as per example, the calpain system (48–51). Thus, we do not discard the hypothesis that the recruitment of LD by the parasite during its replication, could lead to an increase in the synthesis of these LD by the host cell to maintain homeostasis of their vital activities. The homeostasis is maintained by a balance between the cholesterol internalized via the LDL receptor and synthesis involving the enzyme: 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-CoA) redutase (52). In cells infected by *T. gondii*, there is an increase in the

synthesis of receptors for internalization of LDL (5), and the activity of HMG-CoA redutase comes to four times higher (53).

Studies show the involvement of ER from the host cell in synthesis of LD (23). This supplement of lipids could contribute to the increase of the vacuole membrane area during the intracellular development of *T. gondii*, as proposed previously by (8, 54-56). Our ultrastructural cytochemistry analysis demonstrated, for the first time, the direct contact of LD with the vacuolar membrane, its matrix as well as with the parasite membrane during its segregation inside the PV. Structurally, the LD is osmiophilic and consists of cholesteryl esters and triglycerides surrounded by a single monolayer of phospholipids (21, 23). We believe that this recruitment of LD by *T. gondii* may be involved with the deficiency of cholesterol and other lipids by the parasite. However, the host cell needs cholesterol for numerous vital activities. The mechanism by which host-cell-derived lipids are transferred across the PVM to the parasite was uncertain (7). Our data clearly demonstrated: (i) the discharge of the SR to the interior of the PV after 4 h of *T. gondii*-SkMC infection; (ii) the presence of vesicles with different diameters and morphology containing the reaction product for IK localized inside the vacuole after 24 h of parasite-host cell infection. These results are similar to that described by (57) that observed by immunoelectron microscopy the transfer of SR components into the PV, indicating that the fusion occurs between the two compartments and, (iii) the accentuated decrease of the SR demarcation around the PV, after 24 h of infection. This data suggests that components of the SR can be incorporated by the intracellular parasites, constituting a source of nutrients and lipid possibly for its development, as proposed previously (7, 54, 57, 58).

The ER plays a crucial role in cytoplasmic signalling in a variety of cells. It is particularly relevant to SkMC, where this organelle constitutes the main Ca<sup>2+</sup> store for essential functions, such as contraction (59, 60). Our results by electron microscopy showed total reorganization of the SR in *T. gondii*-infected SkMC. Thus, we believe that this phenomenon may lead to changes in Ca<sup>2+</sup> homeostasis compromising the functionality of SkMC. It is described the importance of juxtapositioning of SR, mitochondria and transverse tubules (T-tubules) in muscle cell to better communication between sites of Ca<sup>2+</sup> release which ensures the contraction of myofibrils. As, we suggest that *T. gondii* may be benefiting from the repositioning of the SR sequestered not only lipids, but also the Ca<sup>2+</sup> not used by sarcomeres (61).

It was reported recently the accumulation of the LD within leukocytes in inflammatory conditions by example: bacterial sepsis, allergic lung inflammation, arthritis, and in mycobacterium infections among other (23). However, mechanisms that regulate LD formation and its functional significance to the cellular biology in *T. gondii* infection are not known.

Several studies show: (i) increase of LD numbers produced during infections is related with the generation of eicosanoid (15, 20, 24–26); (ii) that the PGE<sub>2</sub> production is a consequence of COX-

2 gene induction (27). By RT-PCR was analyzed the expression of COX-2 gene showing that after 3 and 24h of *T. gondii*-SkMC interaction, the expression was upregulated. Studies have demonstrated that promoter region of COX-2 reveals several potential regulatory elements, which can affect gene transcription (62). In pancreatic b-cells several transcription factors regulate COX-2 gene expression as per example, the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) that plays a negative role on COX-2 promoter (27). It was described that *T. gondii* can also manipulate the host transcription factors, inclusive inhibiting STAT1 (6). Thus, we suggest that the presence of *T. gondii* in SkMC may be inducing the increased in expression of COX-2, but if the inhibition of STAT1 also occurs still remains uncertain.

We also analyzed the synthesis of PGE<sub>2</sub>. Our results show an important increase of PGE<sub>2</sub> synthesis, from 6h up to 48h of SkMC-*T. gondii* infection. Among other factors, we believe that the success of the infection *T. gondii* in the muscle tissue may be related to the increase in production of COX-2 and consequently of eicosanoids PGE<sub>2</sub>. In other cell types, studies show that the enzymatic conversion of free AA into prostaglandin down-modulates cell-mediated response favoring not only intracellular pathogens, but also the survival of the host (63). These data confirm our hypothesis that the recruitment of LD by *T. gondii* may possibly be related to the development chronic phase in SkMC. Studies with other pathogens show increased of the LD during intracellular infection, per example: *T. cruzi* and *Mycobacterium bovis* BCG induces formation of LD considered intracellular domains for eicosanoid (15, 20, 64). Similarly, we described here that the enhanced capacity of muscle cells to generate PGE<sub>2</sub> in the course of the *T. gondii* infection due to increased LD formation. And so, the recruitment of organelles such as SR by parasite during its host cell interaction, may contribute to the mechanisms that intracellular pathogens have evolved to survive in host cells. Indeed, high concentrations of PGE<sub>2</sub> potently inhibit the Th1 type response, TNF and NO production, and these changes favor intracellular parasite growth (65, 66). Future studies are necessary to characterize the regulation and function of the prostaglandins in SkMC and if the presence of SR in PV may be acting as a source of Ca<sup>2+</sup> what justify the preference of muscle tissue in the development phase chronic toxoplasmosis.

### Material and Methods

All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), by Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz Committee of Ethics for the Use of Animals (license CEUA LW 10/10) and by the Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents (NACLAR).

### Primary culture of skeletal muscle cells

Skeletal muscle cell cultures were obtained from thigh muscles of 18-days-old mouse embryos. The tissues were minced and incubated for 7 min with

0.05% trypsin and 0.01% versene diluted in phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS). After 5-7 dissociation cycles, the enzymatic digestion was interrupted by adding 10% fetal bovine serum at 4°C, the suspension was centrifuged at 650g for 7 min, resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 2% chick embryo extract, 1mM L-glutamine, 1,000 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin and then incubated for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, the culture flask was gently shaken to release the non-attached cells and the supernatant enriched with myoblasts was seeded in 0.02% gelatin-treated 24-well culture plates (for fluorescent assays) or in 35mm-culture plates (for electron microscopy studies), respectively. The cultures were maintained at 37°C up to 3-5 days to obtain the muscle fibers and the fresh medium was added every two days (67).

### Parasites

Tachyzoites of *T. gondii*, RH strain, were maintained in Swiss mice by serial intraperitoneal inoculation of 10<sup>5</sup> parasites after 48-72 h inoculation. The parasites were harvested in PBS and centrifuged (200g for 7-10 min) at room temperature in order to discard off blood cells and cellular debris. The supernatant was collected and then centrifuged again at 1000g for 10 min. The final pellet was resuspended in DMEM and used in the parasite-host cell interaction assays.

### Transmission electron microscopy

SkMC were allowed to interact for 4 to 48 h at 37°C with tachyzoites of *T. gondii* (parasite: host cell ratio 10:1). After washing in PBS, the uninfected and *T. gondii*-infected SkMC were immediately fixed for 30 min at 4°C in 2.5% glutaraldehyde solution (GA) in 0.1M Na cacodylate buffer containing 3.5% sucrose and 2.5mM Ca<sup>+2</sup>, pH 7.2. The cells then were washed in the same buffer and post-fixed for 30 min at 4°C in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) in cacodylate buffer. After fixation, the cells were scraped gently from the plastic dish and centrifuged for 5 min at 10,000 g, dehydrated in acetone and embedded in PolyBed 812 resin. Thin sections were contrasted in uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss EM10C transmission electron microscope.

### Ultrastructural cytochemistry for lipid detection

Ultrastructural cytochemistry for lipid detection was performed as previously described (68). In brief, SkMC infected with *T. gondii* for 4 and 24 h were washed in PBS and fixed for 1h at the room temperature with 2.5% GA in 0.1M Na cacodylate buffer with the addition 3.5% sucrose, pH 7.2. The cultures were washed in the same buffer for 10 min and immediately incubated for another 10 min in 0.1M of imidazole buffer (CH<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), pH 7.5. After washing, the cultures were post-fixed for 30 min at the room temperature in 2% OsO<sub>4</sub> diluted in imidazole buffer, pH 7.5, in the dark. After incubation, the cells were washed twice for 10 min in imidazole buffer and then processed for transmission electron microscopy. The ultrathin sections were contrasted with lead citrate for

1 min and examined in a Zeiss EM10C transmission electron microscope.

#### Ultrastructural cytochemistry for endoplasmic reticulum detection

After 4 and 24 h of interaction with *T. gondii*, the infected SkMC cultures were washed in PBS and fixed for 30 min at the room temperature in 2.5% GA in 0.1 M cacodylate (pH 7.2). The cells were washed twice for 15 min in the same buffer and washed again twice for 10 min in 1% potassium iodide (KI) diluted in distilled water. The cultures were then incubated for 48 h (in the dark) at room temperature in 1% OsO<sub>4</sub> and 1% KI, washed for 10 min in KI solution diluted in distilled water and finally processed as routine for transmission electron microscopy. The ultrathin unstained sections were examined in a Zeiss EM10C transmission electron microscope.

#### Lipid droplet staining and enumeration

Muscle cells infected or not with *T. gondii* (parasite: host cell ratio of 10:1) after 6, 24 and 48 h were fixed in 3.7% formaldehyde in HBSS (pH 7.4) and stained with osmium tetroxide, or BODIPY. For the osmium staining, the slides were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, incubated with 1.5% OsO<sub>4</sub> (30 min), rinsed in H<sub>2</sub>O, immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5 min), rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, reincubated in 1.5% OsO<sub>4</sub> (3 min), rinsed in distilled water, and then dried for further analysis. The morphology of fixed cells was observed, and lipid bodies were enumerated by light microscopy with x100 objective lens in 50 consecutive cells in each slide. The person responsible for counting was blinded to the codes for each slide. Slides were alternatively stained with BODIPY, evidencing the accumulation of neutral lipids in lipid droplet. For the BODIPY staining, the slides were fixed for 10 min in 3.7% formaldehyde, washed and incubated for 15 min with the vital stain BODIPY-493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) or Nile red diluted in PBS, in the proportion of 1:200 and 1:1000 (v/v), respectively. The cultures stained by BODIPY were washed in PBS, incubated for 10 min with 1 μM of To-PRO\_3 iodide-642/661 in PBS to enable the visualization of the nuclei of cells, followed by 4 μg/mL phalloidin-TRITC (binds to the actin cytoskeleton) for 1 h at 37°C for better visualization of SkMC. The coverslips were mounted over the sections with 2.5% 1,4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO). The samples were examined using a Zeiss photomicroscope equipped with epifluorescence and a confocal laser scanning microscope Fluoview 3.2 Olympus, with objective lens of 63x and of 100x (Farmanguinhos/Fiocruz).

#### PGE<sub>2</sub> measurement

PGE<sub>2</sub> levels were measured directly in the supernatant from noninfected muscle cells culture and *T. gondii* infected groups after 6, 24 and 48 h of interaction. The PGE<sub>2</sub> was assayed in the cell-free supernatant by enzyme-linked immunoassay (EIA), according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical).

#### Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA was extracted from SkMC culture samples harvest at three different time points from experimental *T. gondii* infection assay (after 3 h and 24 h). For this purpose, 10<sup>6</sup> cells were harvest and washed three times in PBS and centrifuged at 10.000 g. The supernatant was completely removed and the pellet obtained was used for RNA extraction with the RNeasy kit (Qiagen California, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total mRNA was measured and cDNA was synthesized using oligo(dT) and Superscript III First-Strand System (Invitrogen, cat#18080-051). Real-time PCR was performed on StepOnePlus using Taqman Gene expression assay: COX-2 (Mm01307334\_g1) and HPRT1 (Mm01545399\_m1) obtained from Applied Biosystems. Efficiency curve showed between 88-92%. All qRT-PCR experiments were performed in duplicate, including no-template controls. The relative expression of COX-2 was determined using the 2<sup>(-ddCt)</sup> method.

#### Statistical Analysis

Data were reported as the mean ± S.E. and were analyzed statistically by means of analysis of variance followed by Student's *t* test with the level of significance set at *p* ≤ 0.05.

#### Acknowledgments

The authors thank Carlos Alberto Bizarro Rodrigues from Farmanguinhos/Fiocruz for the production of interferential microscopy images for the aid with confocal microscopy. We are grateful to Sandra Maria de Oliveira Souza and Mariele Delfim Pereira for technical assistance. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Fundação Oswaldo Cruz (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES IV), Pronex - Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - CNPq/FAPERJ and Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

#### References

1. Jones TC, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 1972;136:1173-1194.
2. Carvalho L, De Souza W. Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. *Eur J Cell Biol* 1990;51:211-219.
3. Sibley LD, Pouletty C, Boothroyd JC. Formation and modification of parasitophorous vacuole occupied by *Toxoplasma gondii*. In: Smith, J. (Ed.), *Toxoplasmosis*. Springer-Verlag, Heidelberg Press; 1993, p.63-72.
4. Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* 2000;149:167-180.

6. Laliberté J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1900-1915.
7. Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 2002;115:3049-3059.
8. Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 1997;110:2117-2128.
9. Sinai AP, Joiner KA. Safe Haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:415-462.
10. Portugal LR, Fernandes LR, Pietra Pedrosa VS, Santiago HC, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JL. Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* 2008;10:276-284.
11. D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol* 2008;10:2589-2604.
12. van der Meer-Janssen YP, van Galen J, Batenburg JJ, Helms JB. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog Lipid Res* 2010;49:1-26.
13. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009;10:943-948.
14. Cáceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, Pinto S, Vilaplana C, Cardona PJ. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)* 2009;89:175-182.
15. D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol* 2006;176:3087-3097.
16. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D'Avila H, Dezsö B, Magalhães KG, Castro-Faria-Neto HC, Nagy L, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol* 2009;15:1337-1345.
17. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RC, Manso PP, Sarno EN, Bozza PT, Pessolani MC. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol* 2011;13:259-273.
18. Cocchiari JL, Kumar Y, Fischer ER, Hackstadt T, Valdivia RH. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:9379-9384.
19. Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJ, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2004;54:109-122.
20. Melo RC, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 2003;35:59-67.
21. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* 2002;277:44507-44512.
22. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:373-378.
23. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:540-551.
24. Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan Jr DW, Pyne K, Harvey VS, Galli SJ, Lichtenstein LM. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 1983;131:2965-2976.
25. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997;186:909-920.
26. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation *in vivo*: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 2002;169:6498-6506.
27. Zhang X, Zhang J, Yang X, Han X. Several transcription factors regulate COX-2 gene expression in pancreatic beta-cells. *Mol Biol Rep* 2007;34:199-206.
28. Coppens I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cellular Microbiology* 2006;8:1-9.
29. Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2002;81:111-122.
29. Galli SJ, Dvorak AM, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan Jr DW, Isomura T, Pyne K, Harvey VS, Hammel I, Lichtenstein LM, Dvorak HF. Lipid bodies: widely distributed cytoplasmic structures that represent preferential nonmembrane repositories of exogenous [<sup>3</sup>H] arachidonic acid incorporated by mast cells, macrophages and other cell types, in: J.M. Bailey (Ed.), *Prostaglandins, Leukotrienes, and Lipoxins*, Plenum Publishing, New York Press; 1985, p.221-239
30. Remington JS, Cavanaugh EN. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med* 1965;273:1308-1310.
30. Weller PF, Bozza PT, Yu W, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:450-452.
31. Gherardi R, Baudrimont M, Lionnet F, Salord JM, Duvivier C, Michon C, Wolff M, Marche C. Skeletal

- muscle toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study. *Ann Neurol* 1992;32:535-542.
31. Walther TC, Farese RV Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:459-466.
32. Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30:1217-1258.
33. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009;39:895-901.
34. Barbosa HS. Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:153-154.
35. Barbosa HS, Ferreira-Silva MF, Guimarães EV, Carvalho L, Rodrigues RM. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J Parasitol* 2005;91:182-184.
36. Andrade EF, Stumbo AC, Monteiro-Leal LH, Carvalho L, Barbosa HS. Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J. Submicrosc. Cytol Pathol* 2001;33:337-341.
37. Guimarães EV, Acquarone M, Carvalho L, Barbosa HS. Cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in skeletal muscle cells, *in vitro*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002;44:104.
38. 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.
39. Guimarães EV, Carvalho L, Barbosa HS. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:170-174.
40. Ferreira-da-Silva MF, Barbosa HS, Groß U, Lüder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biosystems* 2008;4:824-834.
41. Ferreira-da-Silva MF, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho L, Groß U, Lüder CG, Barbosa HS. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009a;140:196-200.
42. Ferreira-da-Silva MF, Takács AC, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int J Med Microbiol* 2009b;299:281-288.
43. Kudo I, Murakami M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 2005;30:633-638.
44. Scher JU, Pillinger MH. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 2009;57:703-708.
45. Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol* 1991;138:141.
46. Melo RC, D'Ávila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol* 2011;689:149-161.
47. Gupta N, Zahn MM, Coppens I, Joiner KA, Voelker DR. Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem* 2005;280:16345-16353.
48. Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. *J Anim Sci* 2001;79:2097-2107.
49. Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 2002;12:46-54.
50. Liu X, Schnellmann RG. Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:63-70.
51. Dedieu S, Poussard S, Mazeret G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res* 2004;292:187-200.
52. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430.
53. Blader IJ, Manger ID, Boothroyd JC. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem* 2001; 276:24223-24231.
54. De Melo EJ, De Souza, W. Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct Funct* 1997;22:317-323.
55. Magno RC, Straker LC, de Souza W, Attias M. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal* 2005;11:166-174.
56. Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 2001;154:95-108.
57. Goldszmid SR, Coppens I, Lev A, Caspar P, Mellman I, Sher A. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med* 2009;206:399-410.
58. De Melo EJ, Carvalho TU, De Souza W. Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* 1992;17:311-317.
59. Franzini-Armstrong C, Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* 1997;77:699-729.
60. Puzianowska-Kuznicka M, Kuznicki J. The SR and ageing II: calcium homeostasis. *Ageing Res Rev* 2009;8:160-172.
61. Rossi D, Barone V, Giacomello E, Cusimano V, Sorrentino V. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* 2008;9:1044-1049.
62. Sivaramkrishnan V, Niranjali Devaraj S. Morin regulates the expression of INF-kappaB-p65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Chem Biol Interact* 2009 14;180:353-359.

63. Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002; 106:257-266.
64. Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT, Viola JP. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008;15:1732-1740.
65. Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gerns D. Release of tumor necrosis factor from macrophages: enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol* 1988;141:2388-2393.
66. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991;146:108-113.
67. Barbosa HS, Pereira MCS, Meirelles MNL. Protocolos de culturas primárias. in: Araújo-Jorge, T. and de Castro, S.L. (org), *Doença de Chagas: Manual para experimentação animal*, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro Press; 2000, p.297-313.
68. Argemüller S, Fahimi HD. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem J* 1982;14:823-835.

### Legends

**Figure 1: Confocal laser scanning microscopy showing LD revealed by the Nile Red stain technique in SkMC uninfected and infected with *T. gondii*.** (A) The LD are evident in uninfected SkMC (arrow). Several LD stained in red appears distributed throughout the cell cytoplasm and concentrated around the nucleus (N). (B) The same image visualized by confocal microscopy. (C) Observation of SkMC LD (arrowhead) localized at the site of parasite adhesion at the host cell membrane after 2 h of *T. gondii* infection. (D) After 24 h SkMC infection by *T. gondii*, a clear association of several LD can be seen with the PVM (arrowhead). Bars: 20µm. Insert: Detail of the image. Bar: 5 µm.

**Figure 2: Confocal laser scanning microscopy showing LD revealed by BODIPY stain technique in SkMC uninfected and infected with *T. gondii*.** (A) Control - by interferential microscopy revealing the profile of uninfected culture with the presence of multinucleated myotubes (arrows). (B) Double marking revealing the actin cytoskeleton and nuclei SkMC (arrows) in the red, and LD in green. Note discrete distribution of LD across culture. (C) Interferential microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC (arrows) after 6 h of the interaction. (D) Double marking, in red *T. gondii*-infected SkMC. Myotube revealing distribution LD (larger arrows). Insert: Detail of LD in infected cell, in green (arrow). Note intense staining of LD, in infected cells. Bars: 50 µm. Insert: Detail of the image. Bar: 10 µm

**Figure 3: Confocal microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC after 24 and 48 h of the interaction.** (A) Image by interferential microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC after 24 h. Note

the presence of infected myotubes (thick arrows) and uninfected (thin arrows) in the same culture. (B) Double staining revealing the culture cell, in red. Note uninfected myotubes (thin arrows) practically does not presents marking for LD while cells infected with *Toxoplasma* (thick arrows) have revealed numerous LD, in green. Observe the distribution of LD in the region where the infected cells are found. (C) Interferential microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC after 48 h. Note the presence of infected highly cells (arrows). (D) Double staining *T. gondii*-infected SkMC in red and LD, in green (arrows). Note the major concentration of LD only where infected SkMC are found. Bars: 50 µm

**Figure 4: Ultrastructural cytochemistry using potassium iodide (KI) for detection of sarcoplasmic reticulum (SR).** (A) SR profiles from uninfected SkMC displaying positive reaction product for KI around the nucleus (N) (arrow) and in the cytoplasm (arrowhead). (B) SkMC infected for 4 h with *T. gondii* shows the presence of SR profiles containing the reaction product for KI in the cytoplasm (asterisk), surround the nucleus (N) and the PV (arrow). Demarcation in the complex internal membranar of the parasite could also be observed (arrowhead). (C) Profiles of SR revealed by KI (small arrow) are observed near and in fusion process with PV (asterisk) and also inside the PV (arrowhead). Association of several lipid droplets (LD) darkened - revealed by imidazole technique, can be seen with the PVM (thick arrow). Bars: 0,5 µm. (D) After 24 h of *T. gondii*-SkMC interaction was observed several parasites within the PV containing vesicles of different morphologies and sizes labeled with KI (arrows), and around the nucleus (large arrow). Bar: 1,0 µm

**Figure 5: Ultrastructural analysis.** (A) Image showing lipid droplets (LD) in closed contact with the parasitophorous vacuole (PV) after 2 h of *T. gondii* - SkMC interaction Bar: 0,5 µm. Note inset revealing the conoid of the parasite (P) into close contact with LD (thin arrow). Bar:0,2µm. (B) After 24 h SkMC infection by *T. gondii*, a clear association of several LD can be seen in connection with two PV (asterisks). PM: parasite membrane; PVM: parasitophorous vacuole membrane. Bars: 1,0 µm

**Figure 6: Ultrastructural cytochemistry using imidazol buffer for detection of lipid droplets.** (A) Note lipid droplets (LD) within matrix (asterisk) of the parasitophorous vacuole (PV) and in closed contact with the membrane of the intravacuolar parasite (PM) (arrowhead), after 24 h of *T. gondii*-SkMC interaction. (B) Note the increase of lipid droplets during *T. gondii*-SkMC interaction. Bars: 1,0 µm

**Figure 7: The graphs show the synthesis of LD and PGE<sub>2</sub>, and COX-2 gene expression, in *T. gondii*-infected SkMC.** (A) Columns listed represent the profile of LD in SkMC control with preservation synthesis during the development of culture, in black *T. gondii*-infected SkMC. We observed time-dependent increase of lipid droplets after 6, 24 and 48 h of *T. gondii*-SkMC interaction.



(B) Synthesis of PGE<sub>2</sub> by ELISA. The columns listed represent SkMC control with approximate values in all points. The black columns show infected cultures where there is a time-dependent increase in the production of PGE<sub>2</sub> coincident with the increase of lipid in the same time of interaction (6, 24 e 48 h). (C) By RT-PCR, representation of COX-2 gene expression in *T. gondii*-infected SkMC, after 3 and 24 h. The columns white represent SkMC control with approximate values in all points. The gray columns show infected muscle cells where there is a time-dependent increase in the production of COX-2 gene. T Test: \* P ≤ 0,05

For Peer Review



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

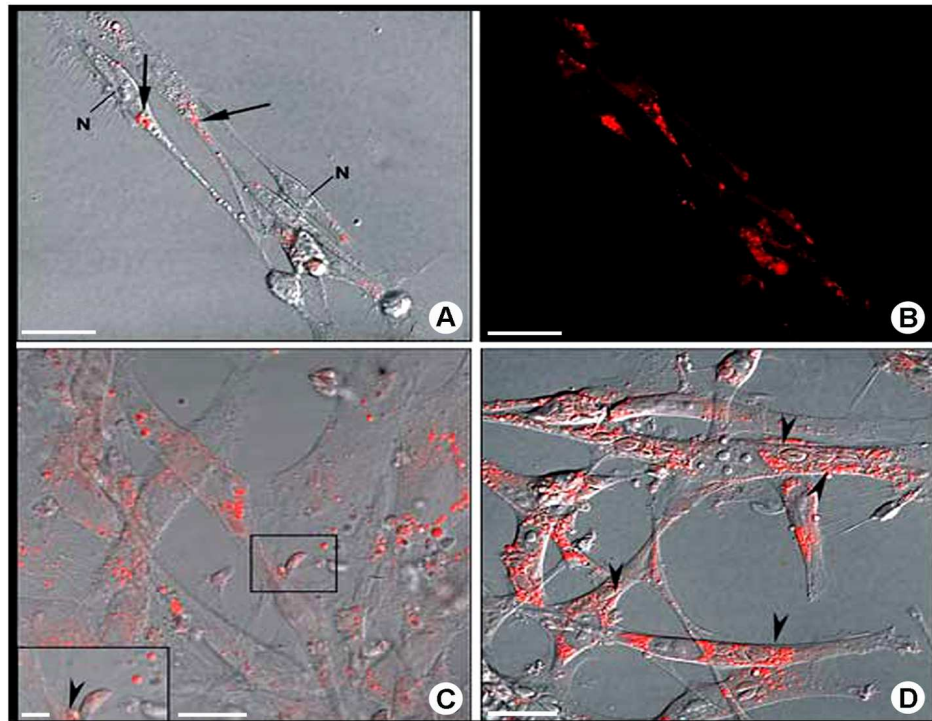
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
*Laboratório de Biologia Estrutural*

March, 21<sup>th</sup>, 2011

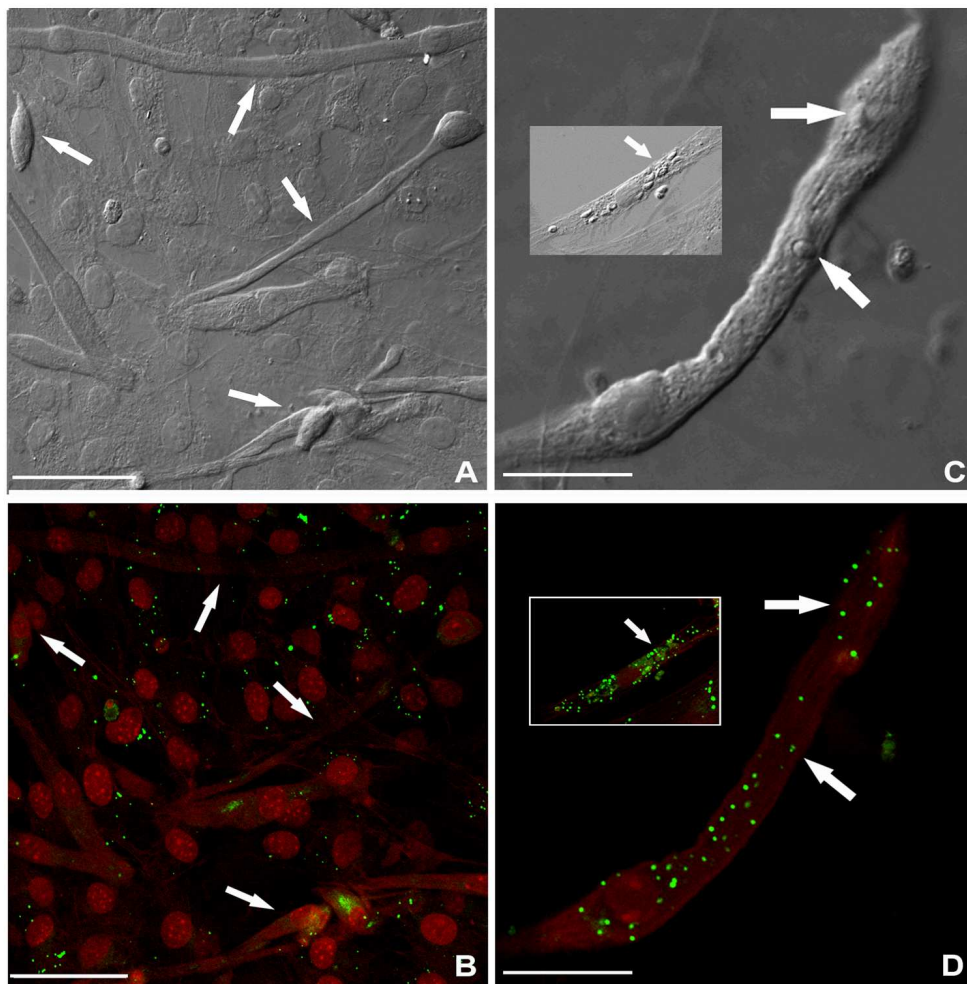
Dear Sir

Please find attached the paper: “*Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplets biogenesis and inflammatory mediator” by Alessandra Ferreira Gomes, Kelly G. Magalhães, Renata M. Rodrigues, Laís de Carvalho, Raphael Molinaro, Patrícia Bozza and Helene Santos Barbosa, to be submitted for publication in Traffic.

Yours sincerely,

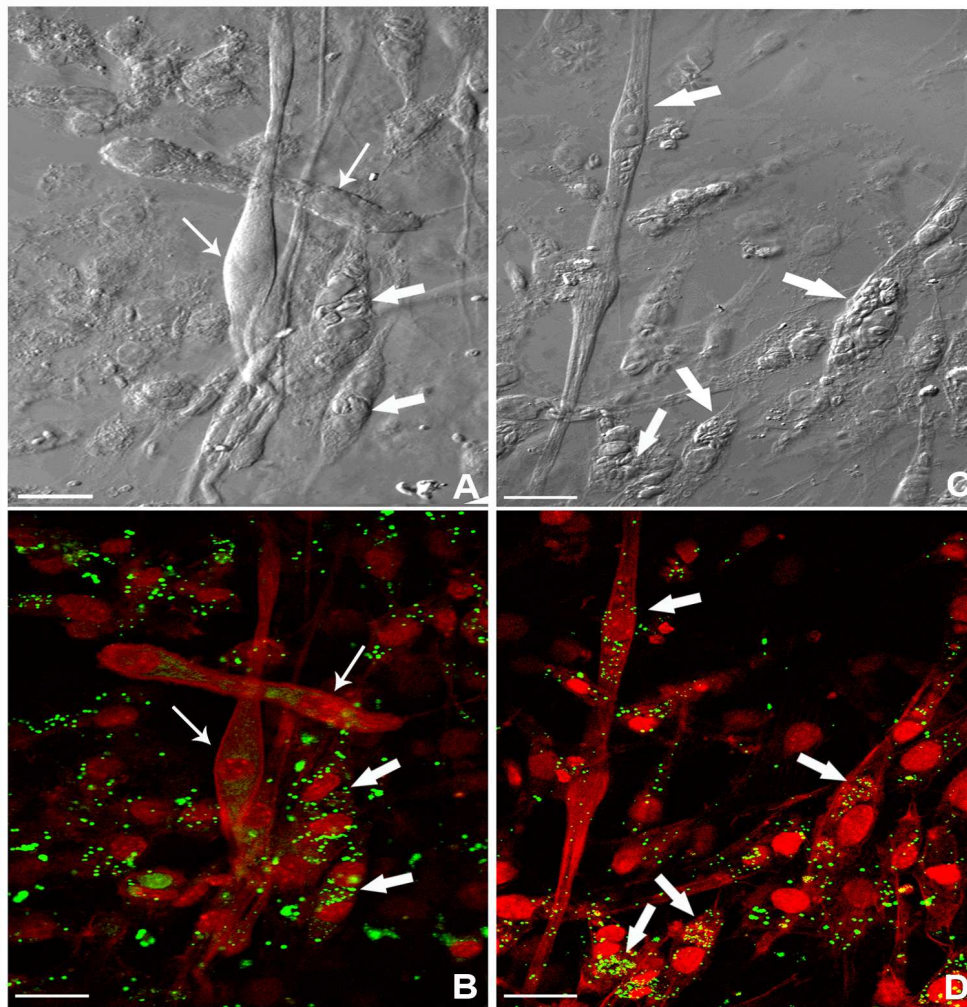


Confocal laser scanning microscopy showing LD revealed by the Nile Red stain technique in SkMC uninfected and infected with *T. gondii*. (A) The LD are evident in uninfected SkMC (arrow). Several LD stained in red appears distributed throughout the cell cytoplasm and concentrated around the nucleus (N). (B) The same image visualized by confocal microscopy. (C) Observation of SkMC LD (arrowhead) localized at the site of parasite adhesion at the host cell membrane after 2 h of *T. gondii* infection. (D) After 24 h SkMC infection by *T. gondii*, a clear association of several LD can be seen with the PVM (arrowhead). Bars: 20 $\mu$ m. Insert: Detail of the image. Bar: 5  $\mu$ m.  
129x99mm (300 x 300 DPI)

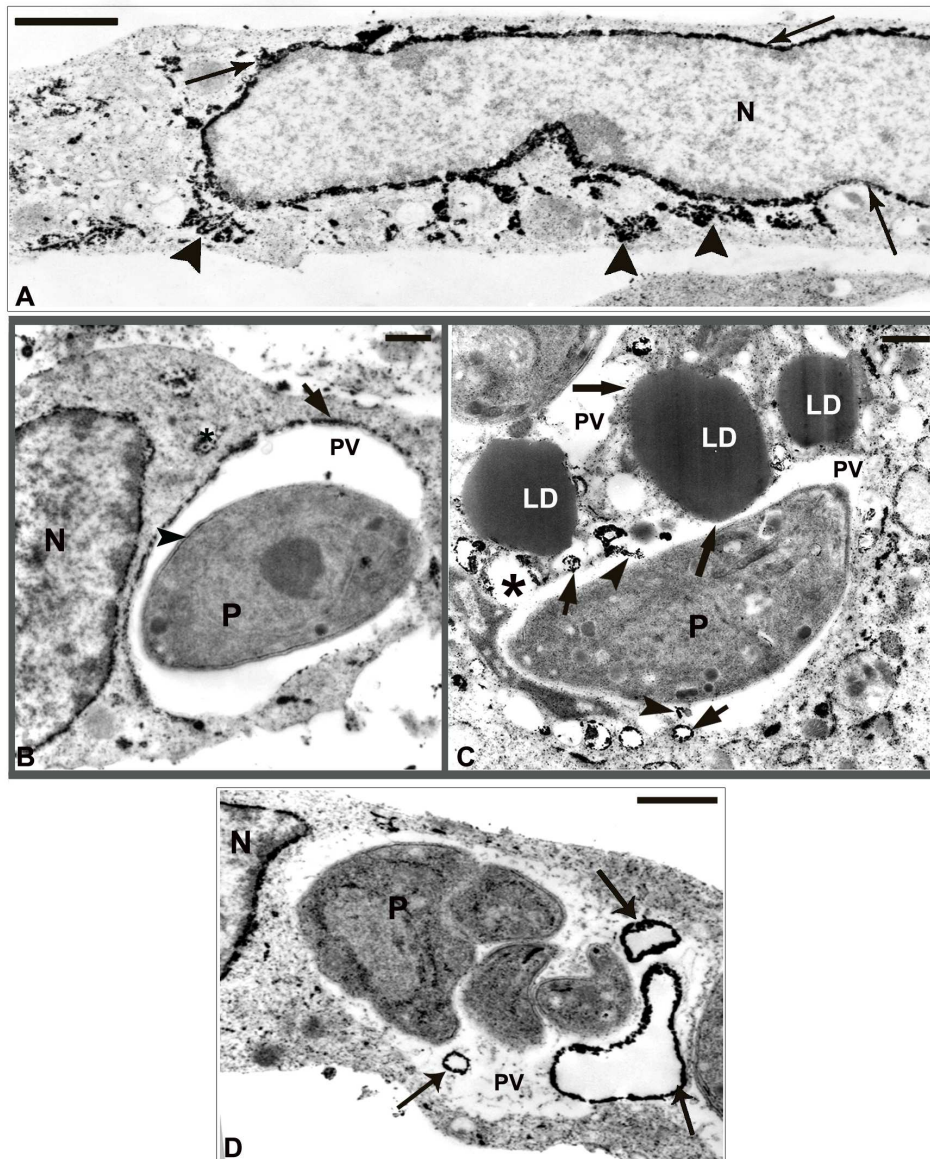


Confocal laser scanning microscopy showing LD revealed by BODIPY stain technique in SkMC uninfected and infected with *T. gondii*. (A) Control - by interferential microscopy revealing the profile of uninfected culture with the presence of multinucleated myotubes (arrows). (B) Double marking revealing the actin cytoskeleton and nuclei SkMC (arrows) in the red, and LD in green. Note discrete distribution of LD across culture. (C) Interferential microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC (arrows) after 6 h of the interaction. (D) Double marking, in red *T. gondii*-infected SkMC. Myotube revealing distribution LD (larger arrows). Insert: Detail of LD in infected cell, in green (arrow). Note intense staining of LD, in infected cells. Bars: 50  $\mu$ m. Insert: Detail of the image. Bar: 10  $\mu$ m

129x129mm (300 x 300 DPI)

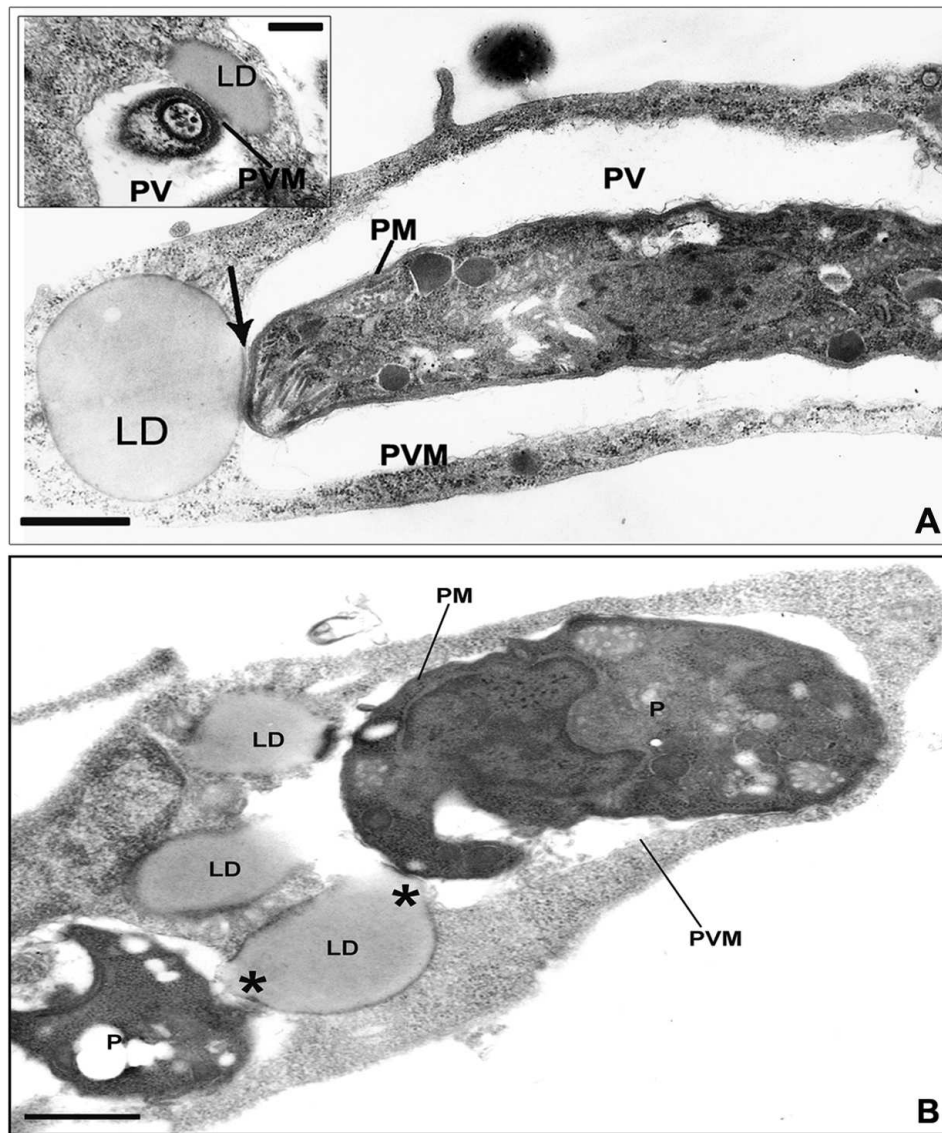


Confocal microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC after 24 and 48 h of the interaction. (A) Image by interferential microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC after 24 h. Note the presence of infected myotubes (thick arrows) and uninfected (thin arrows) in the same culture. (B) Double staining revealing the culture cell, in red. Note uninfected myotubes (thin arrows) practically does not presents marking for LD while cells infected with *Toxoplasma* (thick arrows) have revealed numerous LD, in green. Observe the distribution of LD in the region where the infected cells are found. (C) Interferential microscopy showing *T. gondii*-infected SkMC after 48 h. Note the presence of infected highly cells (arrows). (D) Double staining *T. gondii*-infected SkMC in red and LD, in green (arrows). Note the major concentration of LD only where infected SkMC are found. Bars: 50  $\mu$ m 131x136mm (300 x 300 DPI)



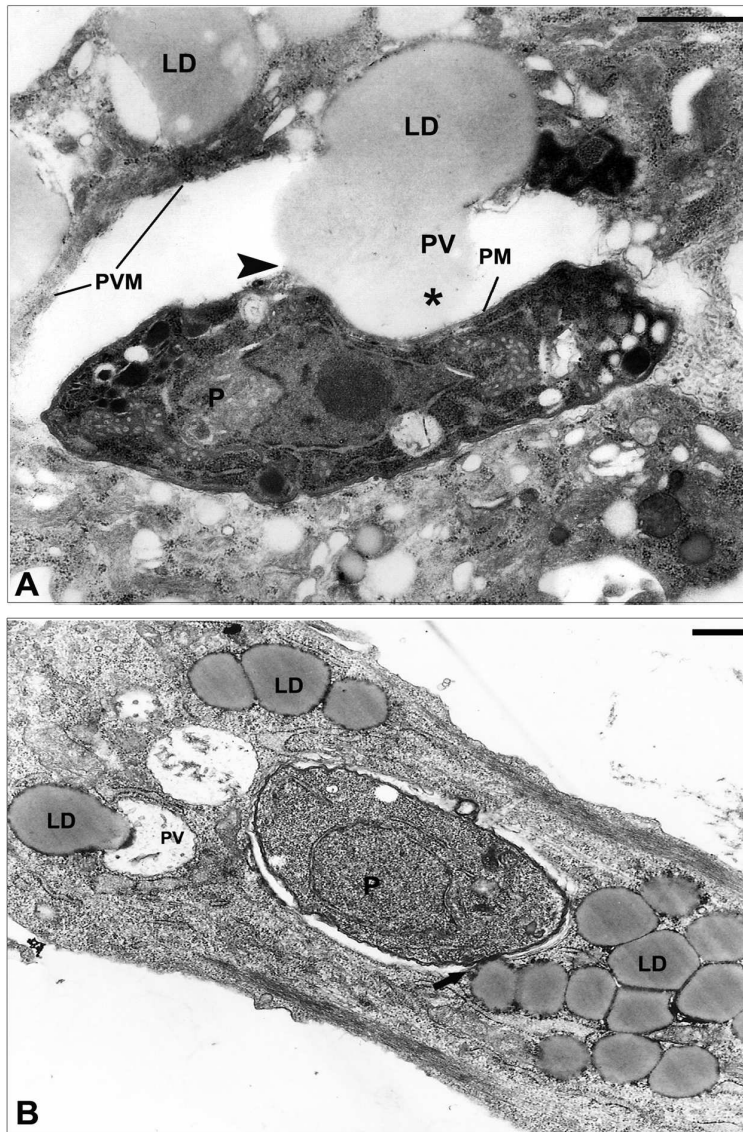
Ultrastructural cytochemistry using potassium iodide (KI) for detection of sarcoplasmic reticulum (SR). (A) SR profiles from uninfected SkMC displaying positive reaction product for KI around the nucleus (N) (arrow) and in the cytoplasm (arrowhead). (B) SkMC infected for 4 h with *T. gondii* shows the presence of SR profiles containing the reaction product for KI in the cytoplasm (asterisk), surround the nucleus (N) and the PV (arrow). Demarcation in the complex internal membranar of the parasite could also be observed (arrowhead). (C) Profiles of SR revealed by KI (small arrow) are observed near and in fusion process with PV (asterisk) and also inside the PV (arrowhead). Association of several lipid droplets (LD) darkened - revealed by imidazole technique, can be seen with the PVM (thick arrow). Bars: 0,5  $\mu\text{m}$ . (D) After 24 h of *T. gondii*-SkMC interaction was observed several parasites within the PV containing vesicles of different morphologies and sizes labeled with KI (arrows), and around the nucleus (large arrow). Bar: 1,0  $\mu\text{m}$   
152x187mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

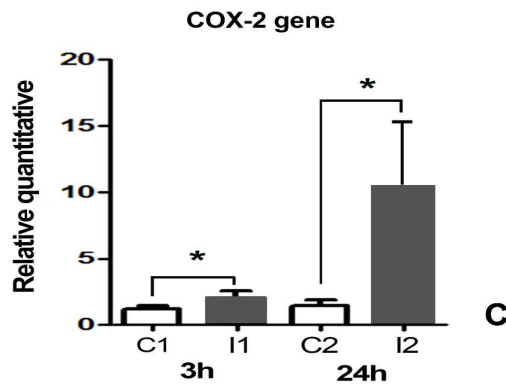
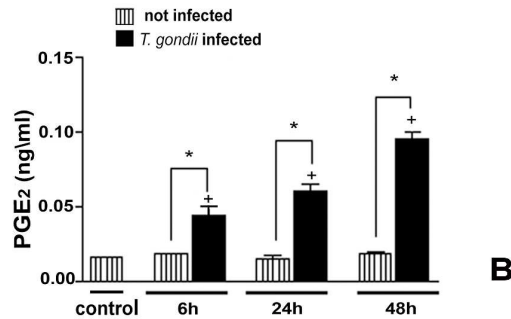
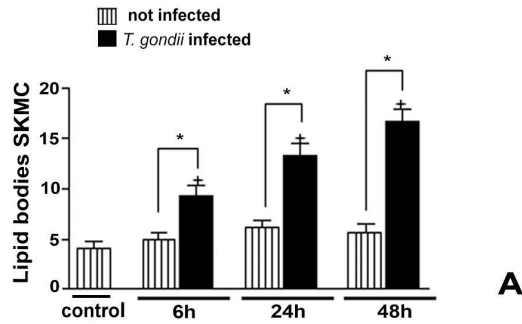


Ultrastructural analysis. (A) Image showing lipid droplets (LD) in closed contact with the parasitophorous vacuole (PV) after 2 h of *T. gondii* - SkMC interaction Bar: 0,5  $\mu\text{m}$ . Note inset revealing the conoid of the parasite (P) into close contact with LD (thin arrow). Bar:0,2  $\mu\text{m}$ . (B) After 24 h SkMC infection by *T. gondii*, a clear association of several LD can be seen in connection with two PV (asterisks). PM: parasite membrane; PVM: parasitophorous vacuole membrane. Bars: 1,0  $\mu\text{m}$   
109x129mm (300 x 300 DPI)





Ultrastructural cytochemistry using imidazol buffer for detection of lipid droplets. (A) Note lipid droplets (LD) within matrix (asterisk) of the parasitophorous vacuole (PV) and in closed contact with the membrane of the intravacuolar parasite (PM) (arrowhead), after 24 h of *T. gondii*-SkMC interaction. (B) Note the increase of lipid droplets during *T. gondii*-SkMC interaction. Bars: 1,0  $\mu\text{m}$  109x170mm (300 x 300 DPI)



The graphs show the synthesis of LD and PGE2, and COX-2 gene expression, in *T. gondii*-infected SkMC. (A) Columns listed represent the profile of LD in SkMC control with preservation synthesis during the development of culture, in black *T. gondii*-infected SkMC. We observed time-dependent increase of lipid droplets after 6, 24 and 48 h of *T. gondii*-SkMC interaction. (B) Synthesis of PGE2 by ELISA. The columns listed represent SkMC control with approximate values in all points. The black columns show infected cultures where there is a time-dependent increase in the production of PGE2 coincident with the increase of lipid in the same time of interaction (6, 24 e 48 h). (C) By RT-PCR, representation of COX-2 gene expression in *T. gondii*-infected SkMC, after 3 and 24 h. The columns white represent SkMC control with approximate values in all points. The gray columns show infected muscle cells where there is a time-dependent increase in the production of COX-2 gene. T Test: \*  $P \leq 0,05$   
80x170mm (600 x 600 DPI)

For Peer Review



Lipid droplets (LD) in closed contact with the parasitophorous vacuole (PV) after 2 h of *T. gondii* - SkMC interaction  
99x71mm (600 x 600 DPI)

review

## ANEXO I

### Estudo histopatológico do tecido muscular esquelético de embriões murinos com toxoplasmose congênita

#### 1. Justificativa

O *Toxoplasma gondii* é um parasito que se mantém durante a fase crônica da doença sob a forma de cistos teciduais, principalmente no cérebro e músculo esquelético. O *T. gondii* tem sido implicado na gênese das miopatias inflamatórias e é de grande importância médica devido à toxoplasmose congênita (TC) (Hasene e cols., 2008; Habib e cols., 2011). Infecções adquiridas no período uterino ou no pós-natal desempenham um papel proeminente na morbidade perinatal e na infância (Shet., 2011). A capacidade de transmigrar através da placenta para replicar em diferentes tecidos fetais, sem ser afetado pelo sistema imunológico do feto, faz da infecção pelo *Toxoplasma* uma importante causa de complicações pré-natais. Isto pode interferir gravemente no desenvolvimento do feto, levando eventualmente ao aborto e a patologias graves no nascimento até seqüelas mais tardias, ainda na infância, adolescência ou vida adulta (Ambroise-Thomas & Pelloux 1993; Senegas e cols., 2009; Shet., 2011). Dentre as seqüelas mais comuns destacamos: encefalites, alterações do estado mental, convulsões, fraqueza, distúrbios de nervos cranianos, alterações sensoriais, distúrbios do movimento, miocardites e polimiosites. A retinocorioidite aguda é uma patologia das mais graves, podendo desenvolver, além de uma hipervascularização do vítreo, a necrose da retina, com perda total da visão, (Holland e cols., 1989; Gheradi e cols., 1992; Morhun e cols., 1996; Weiss e Dubey, 2009). O estudo das patologias decorrentes da infecção pelo *Toxoplasma* no tecido muscular tem sido desenvolvido a partir de camundongos adultos infectados (Tonino e cols., 1996; Stahl e cols., 2004; Senegas e cols., 2009). A influência do *Toxoplasma* no tecido muscular durante o desenvolvimento embrionário no modelo murino não tem sido explorada, apesar da predileção deste parasito pelo músculo no estabelecimento da fase crônica da doença. É descrito, no entanto, que a toxoplasmose pode causar miosites, quer por infecção recente ou reativação dos cistos teciduais, tanto em indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes (Hasene e cols., 2008). Desta forma, resolvemos investigar a participação do *T.*

*gondii* no processo de formação do tecido muscular de embriões murinos com TC, a fim de confirmar os nossos resultados *in vitro* que mostraram a interferência importante do parasito no processo da miogênese. O emprego do músculo esquelético, como modelo de estudo da toxoplasmose experimental, abre novas perspectivas para o entendimento da biologia do parasito e de sua interação com uma das células de eleição para o estabelecimento da fase crônica da doença (Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008, 2009; Ferreira-da-Silva e cols., 2008, 2009a, b).

## **2. Objetivo**

Estudar as alterações morfológicas e estruturais das células do músculo esquelético de embriões de camundongos suíços com toxoplasmose congênita, correlacionando com o distúrbio da miogênese observado nas investigações, *in vitro*.

## **3. Desenhos experimentais**

Para o estudo da toxoplasmose congênita, fêmeas de camundongos suíços no período de acasalamento foram divididas em dois grupos e inoculadas com aproximadamente 25 (grupo 1) ou 50 cistos (grupo 2) de *T. gondii* da cepa ME-49. Após infecção as fêmeas foram colocadas em gaiolas apropriadas com um macho da mesma idade e espécie. As fêmeas que sobreviveram foram submetidas à cesariana com aproximadamente 18 dias pós-coito, seus embriões vivos ou não, retirados e separados.

Visando o diagnóstico das possíveis alterações morfológicas causadas pela presença do parasito nos embriões de fêmeas com toxoplasmose, o tecido muscular das coxas desses embriões foi coletado, seccionado no sentido longitudinal e fixado em solução Millonig-Rosman (10% de formaldeído em tampão fosfato). Os tecidos então foram processados para impregnação em parafina e os cortes de 3 µm de espessura foram corados como de rotina pela hematoxilina e eosina (HE), visando a avaliação comparativa de parâmetros morfo-estruturais e parasitológicos. Alternativamente, parte do material foi processada para congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e os cortes de 5 µm de espessura foram obtidos a -25°C no criostato Leica CM1800 (Alemanha), aderidos em lâmina tratada com poli-L-lisina e fixados em 4% PFA em PBS.

#### 4. Resultados preliminares

A gravidade da infecção pelo toxoplasma nas fêmeas e nos embriões dependeu da concentração de parasitos (cistos) inoculados. Com relação ao grupo 1 (Fig. 1A), nossos experimentos mostraram: reabsorção fetal, abortos e natimortos com uma taxa de perda de mais de 50%. Dos embriões obtidos vivos para extração do tecido muscular, observamos que os mesmos estavam caquéticos e com fraqueza nos membros posteriores. Os natimortos apresentavam patologia hepática extensa marcada por necrose, dilatação abdominal com grande retenção de líquidos, aparente inchaço do baço, hemorragia pulmonar e cutânea (dados não mostrados). Macroscopicamente foi possível observar além do inchaço, a má formação dos membros anteriores e posteriores dos embriões (Fig. 1B) com o comprometimento funcional das patas. Alguns embriões tinham o desenvolvimento muito comprometido, como a má formação do tronco, como pode ser notado na figura 1C e total ausência dos membros posteriores (Fig. 1C e 1D).

Houve uma perda de aproximadamente 100% das fêmeas inoculadas com 50 cistos e dos respectivos embriões do grupo 2. Apesar de fecundada, a maioria das fêmeas não chegou ao final da gestação, muitas reabsorveram os embriões e morreram em poucos dias.

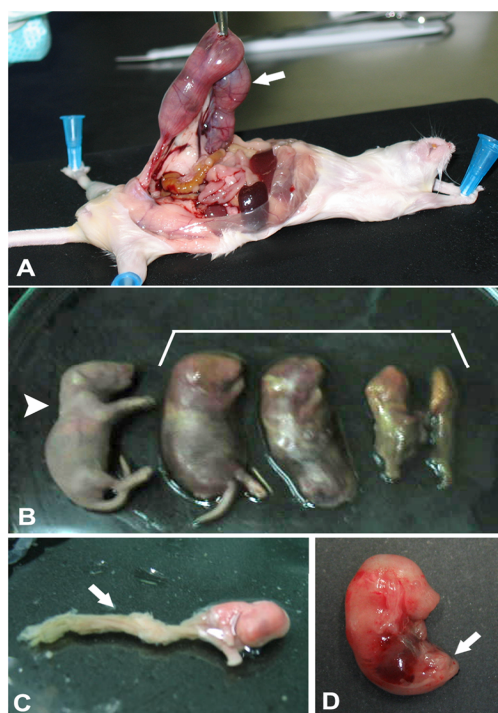
**Análise histopatológica:** Em secções longitudinais do tecido muscular adulto de fêmea grávida infectada com 25 cistos de *T. gondii* (grupo 1), estruturas semelhantes a cistos foram encontradas entre as miofibras (Fig. 2A). Em várias secções observamos parasitos aparentemente evadindo destes cistos e no interior de células (Fig. 2B e C). Em geral, no tecido muscular de coxas de embriões murinos sadios observamos grande densidade de miofibras maduras dispostas longitudinalmente e pequeno espaço interfibrilar. As miofibras de embrião sadio mostraram-se mais densas, coradas com perfil estriado e bem organizadas (Fig. 3A, C, E). Mesmo em regiões onde estas fibras aparecem espaçadas a quantidade de células mononucleares provenientes do tecido conjuntivo ou de infiltrado inflamatório é notavelmente pequena (Fig. 3A, C, E). Entretanto, o músculo de embriões com TC, quando comparados com o tecido sadio, apresentou menor densidade de miofibras e maior espaço interfibrilar, preenchido por células do tecido conjuntivo e provavelmente células mononucleares de infiltrado inflamatório como, por exemplo: macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos (Fig. 3B, D e F). Além da escassez de miofibras e principalmente miofibras maduras, o tecido muscular analisado de

embriões com TC, apresentou várias células bipolares com núcleos pequenos e alongados, caracterizando mioblastos em processo de alinhamento e fusão (Fig. 3D). Miofibras de embriões murinos com TC mostraram-se: descontínuas, menores, menos densas, pouco coradas, com maior espaço interfibrilar, aparentemente imatura com poucos núcleos e com o perfil estriado menos definido (Fig. 3B, D e F).

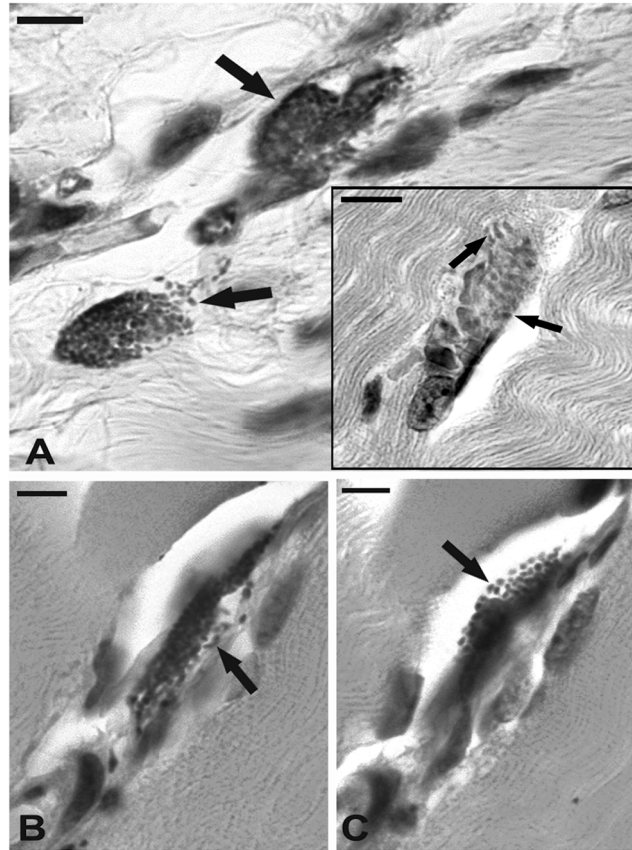
## 5. Perspectivas

É de conhecimento que o *T. gondii* pode causar miosites, quer por infecção recente ou reativação dos cistos teciduais comprometendo a homeostase do tecido muscular (Hasene e cols., 2008). Estudos histopatológicos mais aprofundados estão sendo realizados, considerando-se que nossas análises preliminares apontaram claramente que embriões de uma mesma ninhada tiveram influência diferenciada no grau de comprometimento do desenvolvimento embrionário induzido pelo *Toxoplasma*. Nesta linha, faz-se necessário um estudo mais sistematizado quanto ao processo de formação do tecido muscular de embriões murinos com TC, como por exemplo, a exploração de proteínas diretamente envolvidas neste processo, incluindo as proteínas de adesão e do citoesqueleto, importantes como já discutimos, na formação e estabilidade do tecido muscular (Harris e Tepass, 2010).

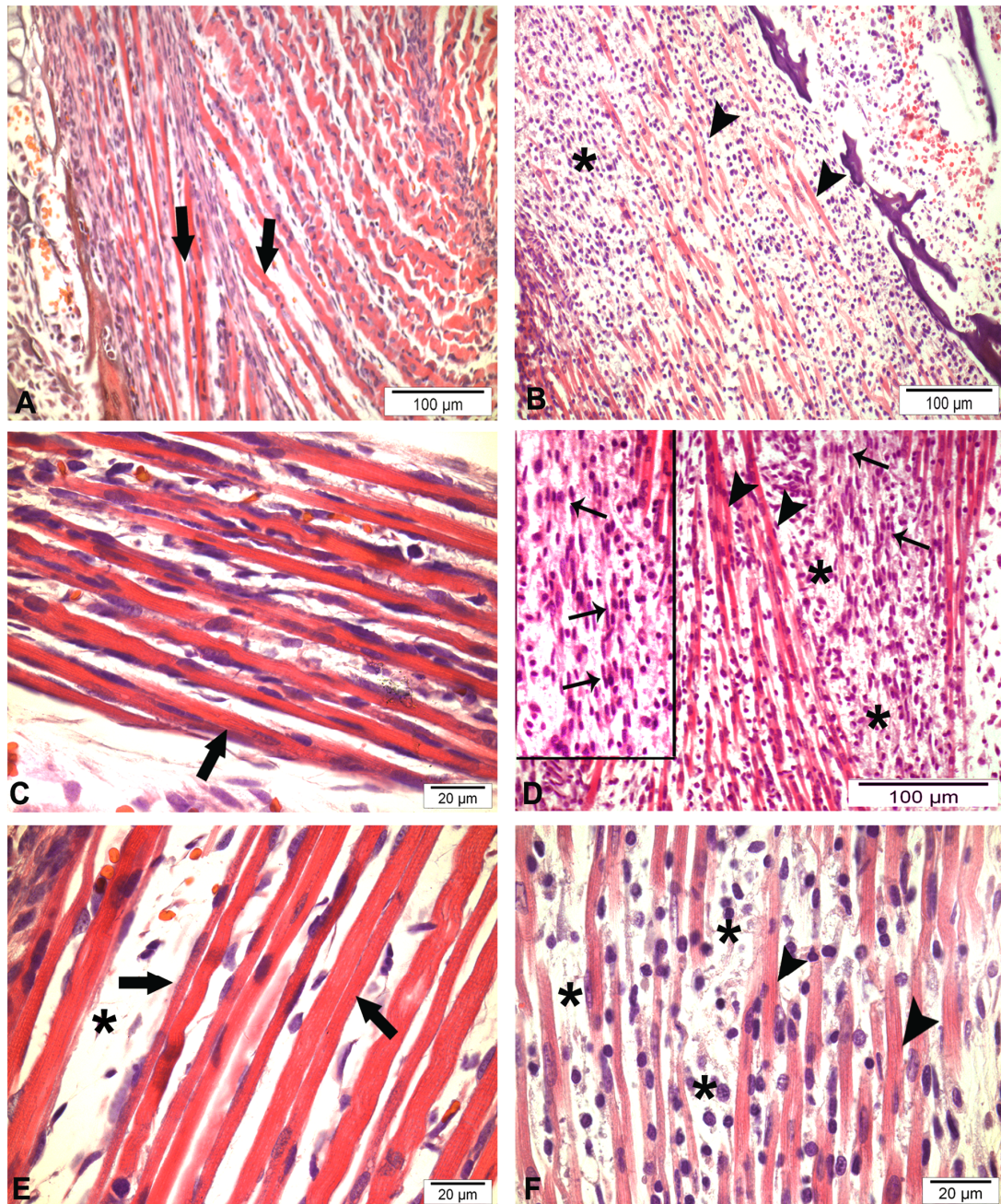




**Fig. 1: Embriões de camundongo suíço com TC.** (A) Colheita dos embriões por cesariana (seta). (B) Cinco embriões de mãe experimentalmente infectada com *T. gondii*. Note o primeiro aparentemente não acometido pela TC (cabeça de seta) e outros quatro natimortos em diferentes graus de comprometimento pela TC. (C) Embrião natimorto apresentando má formação com comprometimento do tronco e membros posteriores. (D) Embrião com TC natimorto e com má formação dos membros posteriores.



**Fig. 2:** Por microscopia de luz, secções longitudinais do tecido muscular adulto de fêmea grávida infectada com 25 cistos de *T. gondii* (Grupo 1). (A) Estruturas semelhantes a cistos podem ser vistas entre as miofibras (setas). Note que os parasitos parecem evadir destas estruturas (inset- setas). (B) e (C) A mesma célula pode ser vista em dois planos focais distintos apresentando pequenas estruturas semelhantes ao Toxoplasma (setas).



**Fig. 3: Por microscopia de luz, seções longitudinais do tecido muscular de coxas de embriões murinos com TC.** (A) Aspecto geral do músculo esquelético de embrião sadio. Note a grande densidade das miofibras maduras dispostas longitudinalmente e pequeno espaço interfibrilar (setas). (B) Músculo de embrião com TC. Menor densidade das miofibras (cabeça de seta) e maior espaçamento entre elas, preenchido por células provavelmente do tecido conjuntivo e células mononucleares de infiltrado inflamatório como: macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos (asteriscos). (C) Em maior aumento observam-se miofibras densas e maduras, dispostas paralelamente e com muitos núcleos. Note pouco espaço

interfibrilar e poucas células mononucleares entre as miofibras. (D) Músculo de embrião com TC apresentando escassez de miofibras (cabeça de seta). Além de maior espaço interfibrilar, podemos observar grande quantidade de células mononucleares (asterisco). Note a presença de várias células bipolares com núcleos pequenos e alongados (setas finas). Inset - revelando em maior detalhe estas células alinhadas caracterizando-se como mioblastos em processo de alinhamento e fusão. (E) Detalhe das miofibras de embrião sadio. Veja maior densidade citoplasmática destas miofibras que se apresentam mais coradas, com perfil estriado e mais organizadas. Nota-se no espaço interfibrilar que a quantidade de células mononucleares é notavelmente menor (asterisco). (F) Miofibras de embriões murinos com TC mostram-se menores, menos densas, pouco coradas e mais espaçadas (asterisco). Aparentemente são células imaturas (menos núcleos e material citoplasmático) e descontínuas em sua extensão (cabeça de seta).

## ANEXO II

### Papel do interferon-gama e interleucina-12 na síntese e organização da actina em células musculares esqueléticas infectadas com *T. gondii*

#### 1. Justificativa

A grande maioria dos trabalhos da interação *T. gondii*-célula hospedeira tem concentrado atenção nos mecanismos celulares e imunológicos que ocorrem durante a fase aguda da doença, utilizando como modelo experimental macrófagos ou linhagens celulares. Um estudo direcionado tendo como alvo a célula muscular esquelética (CME) se reveste de importância, considerando-se que a fase crônica da doença, ocorre principalmente no cérebro e na musculatura esquelética. Além disso, é de conhecimento corrente a importância que o tecido muscular assume na disseminação da toxoplasmose, através do consumo de carne contendo cistos do parasito (Tenter e cols., 2000; 2009).

Durante a sua estada na célula hospedeira, o *T. gondii* não interage diretamente com a via endocítica, muito embora esteja contido pela membrana do vacúolo parasitóforo (MVP). Dentro do vacúolo o parasito pode sofrer interconversão do estágio taquizoíta para bradizoíta, formando o cisto tecidual. No caso da CME esta interconversão é espontânea e caracteriza o processo central na patogênese e longevidade da infecção neste modelo celular (Lyons e cols., 2002; Ferreira-da-Silva e cols., 2009a, b). No entanto, os mecanismos envolvidos no processo da cistogênese no tecido muscular, ainda não estão totalmente esclarecidos (Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008; 2009; Ferreira-da-Silva e cols., 2008, 2009 a, b). Sabe-se que algumas citocinas, como a interleucina-12 (IL-12) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) estão diretamente envolvidas no processo da cistogênese (Laliberté e Carruthers, 2008). Desta forma, este estudo visa investigar: (i) a síntese de IL-12 e IFN- $\gamma$  pelas CME, bem como a influência destas citocinas na persistência do *T. gondii* neste modelo celular; (ii) as vias de sinalização ativadas pelo IFN- $\gamma$  correlacionando a participação de proteínas do citoesqueleto, como a  $\alpha$ -actina, na

manutenção do vacúolo parasitóforo (VP), o que poderia garantir um ambiente intracelular favorável para o início da cistogênese. Este trabalho pretende contribuir com novos dados da biologia celular de CME, fornecendo subsídios que possam interferir no quadro da disseminação da toxoplasmose.

## **2. Objetivo**

Investigar o papel das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  durante a infecção de CME pelo *T. gondii*.

## **3. Desenho experimental**

Para este estudo foi empregado, como modelo celular, culturas primárias de células musculares esqueléticas, a partir do tecido de coxas de embriões de camundongos. O tecido foi dissociado enzimaticamente, os mioblastos semeados em placas de cultivo celular em meio DMEM e a miogênese reproduzida *in vitro*. (ver detalhes em Barbosa e cols., 2000).

Para o estabelecimento da infecção foram utilizados taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* isolados de camundongos suíços, após 72 horas de infecção (ver detalhes em Stumbo e cols., 2002).

Para o estudo da produção de citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  pelas CME durante a miogênese e a infecção pelo *T. gondii*, culturas infectadas após 6, 24 e 48 h de interação foram analisadas através da dosagem das citocinas pelo método de ELISA (imunoensaio utilizando anticorpos conjugados à enzima).

Para analisar a expressão da  $\alpha$ -actina em culturas de CME normais e infectadas com o *T. gondii* foi empregada técnica de Western Blot. As amostras foram coletadas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) acrescido de inibidores de protease (1  $\mu$ M/ml E-64, 1 mM/ml PMSF e 1  $\mu$ M/ml pepstatina) e dosadas por Folin. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em 10% de gel de poliacrilamida, em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com TBS + 0,05% Tween + 5% de leite e incubadas overnight com anticorpo primário anti- $\alpha$ -actina (Sigma, monoclonal A-2172). Após lavagens em TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário

conjugado à fosfatase alcalina. Após a revelação das bandas, as membranas de "immunoblotting" foram digitalizadas e a expressão das proteínas analisada quantitativamente por densitometria, utilizando o programa "Image J". A massa molecular da  $\alpha$ -actina foi calculada tendo por base a massa molecular de proteínas do padrão pré-corado (150 -15 kDa). Assim, foi detectada uma proteína de 42 KDa que corresponde ao peso molecular da  $\alpha$ -actina. Para o controle da proteína total aplicada por lene foi utilizado o gel "Commasie Brilliant Blue-stained". A significância das diferenças na expressão da  $\alpha$ -actina de culturas normais e infectadas com o *T. gondii* após 3 e 24 h foi determinada pelo teste t Student, considerando-se o nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

#### **4. Resultados preliminares**

##### **4.1 Dosagem de citocinas em cultura primária de células musculares infectadas pelo *T. gondii***

Em culturas de células musculares infectadas com *T. gondii* após 6, 24 e 48 h de interação ocorreu um aumento significativo da produção destas citocinas. Um incremento médio nos níveis de IL-12 no sobrenadante de culturas infectadas foi de 3.2 vezes após 6 h de interação, seguido de 4.5 vezes após 24 h e de 4 vezes após 48 h de interação. Com relação aos níveis de IFN- $\gamma$  o aumento foi bastante acentuado da ordem de 3.4 vezes ao longo das primeiras 24 h de interação e de 3 vezes ao final das 48 h, quando comparados aos valores encontrados nos grupos controle, não infectados (Fig. 1A e B).

##### **4. 2 Remodelamento dos microfilamentos de actina em culturas de CME infectadas pelo *T. gondii***

Por microscopia confocal todas as células da cultura: miofibroblastos, mioblastos (CME mononucleados) e miotubos (CME multinucleados), mostraram que a modulação de actina (globular) ou na sua forma filamentosa, foi dependente do tempo e da quantidade de parasitos intracelulares. Os microfilamentos de actina foram revelados pela faloidina-FITC ou TRITC em todos os tipos celulares presentes nas culturas. Em mioblastos e miotubos, que correspondem a mais de 70% das células da cultura, a proteína actina foi visualizada preferencialmente ao longo do eixo principal da célula, formando feixes paralelos e ainda, preenchendo todo citoplasma, com uma leve concentração nas extremidades e abaixo do sarcolema

(fibra de estresse) (Fig. 2A). Em geral, o mesmo perfil de distribuição de actina foi observado em todas as células musculares da cultura, infectadas e não infectadas com o *T. gondii* após 3 h de interação (Fig. 2 B e C). Somente algumas células mais infectadas apresentam poucas mudanças, que se caracterizavam pela maior concentração de actina na periferia e marcação menos intensa na região onde se localizavam os parasitos (Fig. 2B-inset). Em miofibroblastos não infectados, os filamentos de actina foram observados mais concentrados abaixo da membrana celular e formando fibras de estresse, como feixes paralelos irradiando a partir do núcleo para a periferia da célula (Fig. 2C e 3A). Em miotubos, após 24 h de interação, foi observada marcação menos intensa da actina no local da infecção, acompanhada pelo espaçamento entre estes microfilamentos (Fig. 3B - inset). Mioblastos são as células menores e as mais numerosas da cultura e apresentaram altos níveis de infecção pelo *T. gondii*, após 24 e 48 h de interação, com alteração da disposição da actina, sendo mais concentrada nas bordas (Fig. 3B e C). Um dado importante foi que em todas as culturas infectadas, as células não parasitadas não apresentaram qualquer alteração na disposição da actina, em todos os tempos de interação com o *T. gondii*.

Algumas células da cultura após 48 h de interação com *T. gondii* mostraram que ocorreu uma drástica mudança no perfil de marcação para actina. Como pode ser observado na figura 3C, houve uma maior concentração da proteína em forma de grânulos, ao redor do VP e também rompimento dos filamentos de actina próximos a este aglomerado de actina. De destaque, foi a presença de parasitos ainda dispostos sob a forma de roseta, sem qualquer evidência estrutural de egresso. Em outras células da cultura foi possível verificar imagens sugestivas de egresso destes parasitos, com base na ausência de actina ao redor do vacúolo e pela visível desorganização destes microfilamentos nesta região, como pode ser visto em três cortes seqüenciais da mesma célula (Fig. 4A, B e C).

#### **4.3 Análise bioquímica da expressão da $\alpha$ -actina de CME infectadas com *T. gondii***

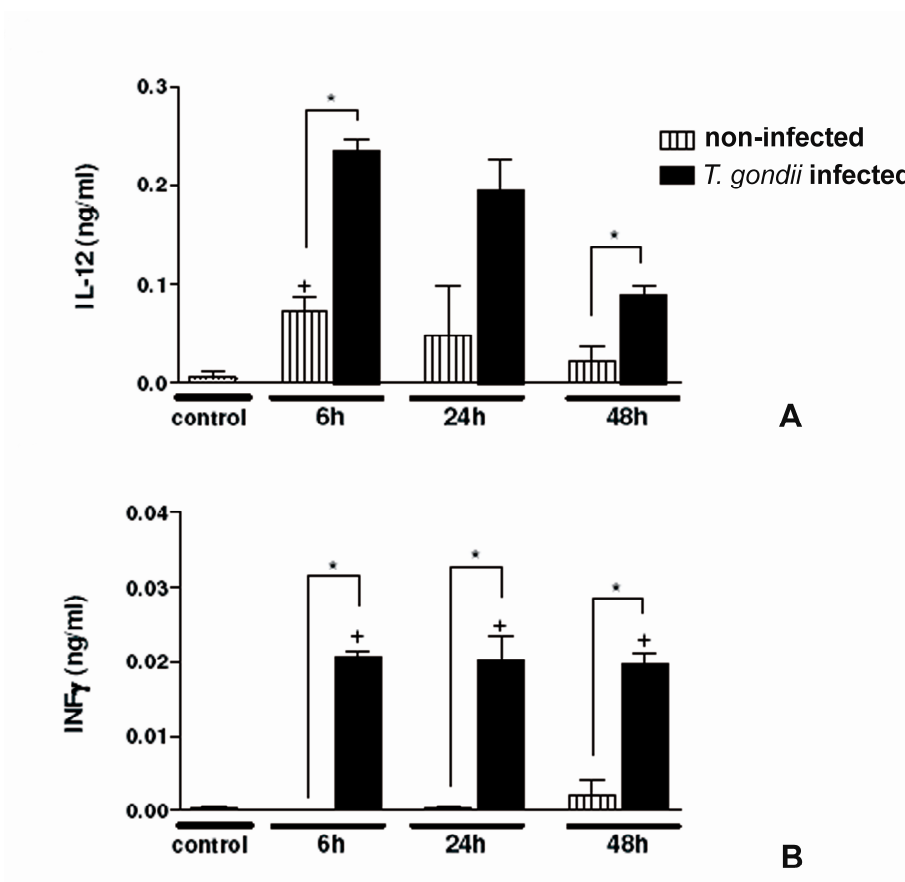
A análise por Western Blot revelou a presença de uma proteína com massa molecular de 42 KDa, compatível com a  $\alpha$ -actina, em extratos protéicos de culturas de CME normais ou infectadas pelo *T. gondii*. Os dados quantitativos preliminares revelaram um aumento na expressão de  $\alpha$ -actina após 3 e 24 h de infecção na



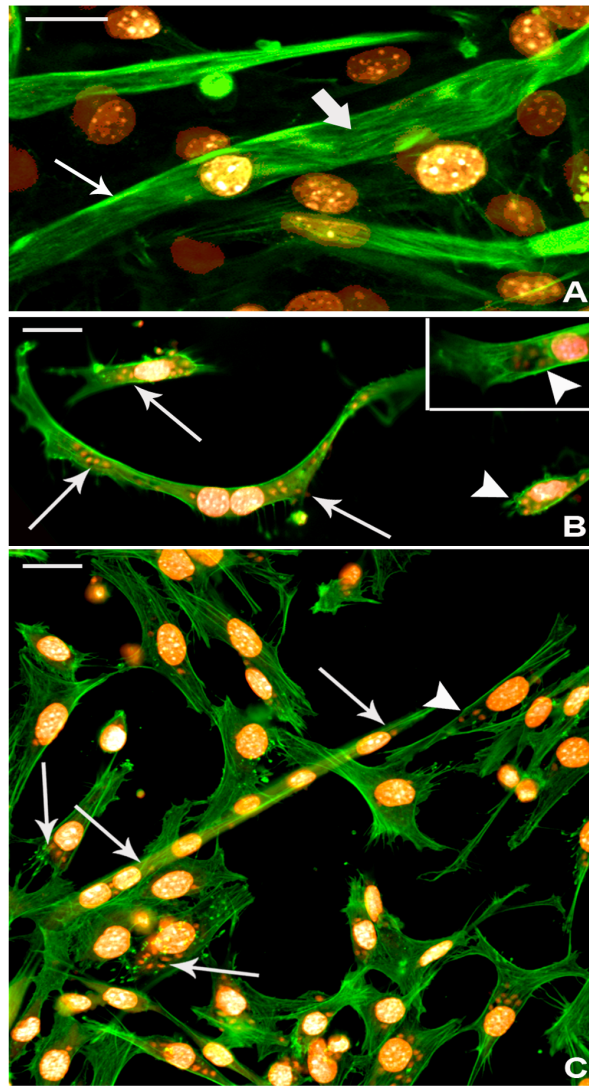
proporção de 0.36 e 5 vezes superior ao controle sem infecção, respectivamente (Fig. 5).

## 5. Perspectivas

Essa linha de pesquisa abre novas perspectivas de estudo que possam esclarecer a função da IL-12 e IFN- $\gamma$  durante a infecção de CME pelo *T. gondii*. Poderá contribuir ainda, para a definição se o tipo celular tem um papel crítico para o desenvolvimento da cistogênese. Dessa forma, um estudo direcionado comparando-se diferentes tipos celulares envolvidos ou não com o desenvolvimento de cistos teciduais, associado à resposta celular quanto à produção de citocinas durante a infecção, poderá auxiliar no entendimento da indução da conversão dos parasitos. Uma outra abordagem é investigar a expressão do mRNA  $\alpha$ -actina esquelética e de músculo liso, para o músculo e miofibroblastos, respectivamente, através da técnica de RT-PCR, objetivando desvendar se o parasito impõe à célula hospedeira a regulação de síntese de actina, que possa determinar seu destino intracelular. Uma estratégia para esse monitoramento é empregar outras cepas, por exemplo, avirulentas a fim de se comparar o desempenho da célula na produção de citocinas e o papel do citoesqueleto de actina frente a perfis de diferentes cepas e tipos celulares. O emprego de células comprometidas com a fase crônica da toxoplasmose nestas abordagens é restrito e nossa meta é desenvolver protocolos experimentais visando esclarecer o papel efetor da célula hospedeira nos processos da cistogênese que garanta a expansão e manutenção do parasitismo.

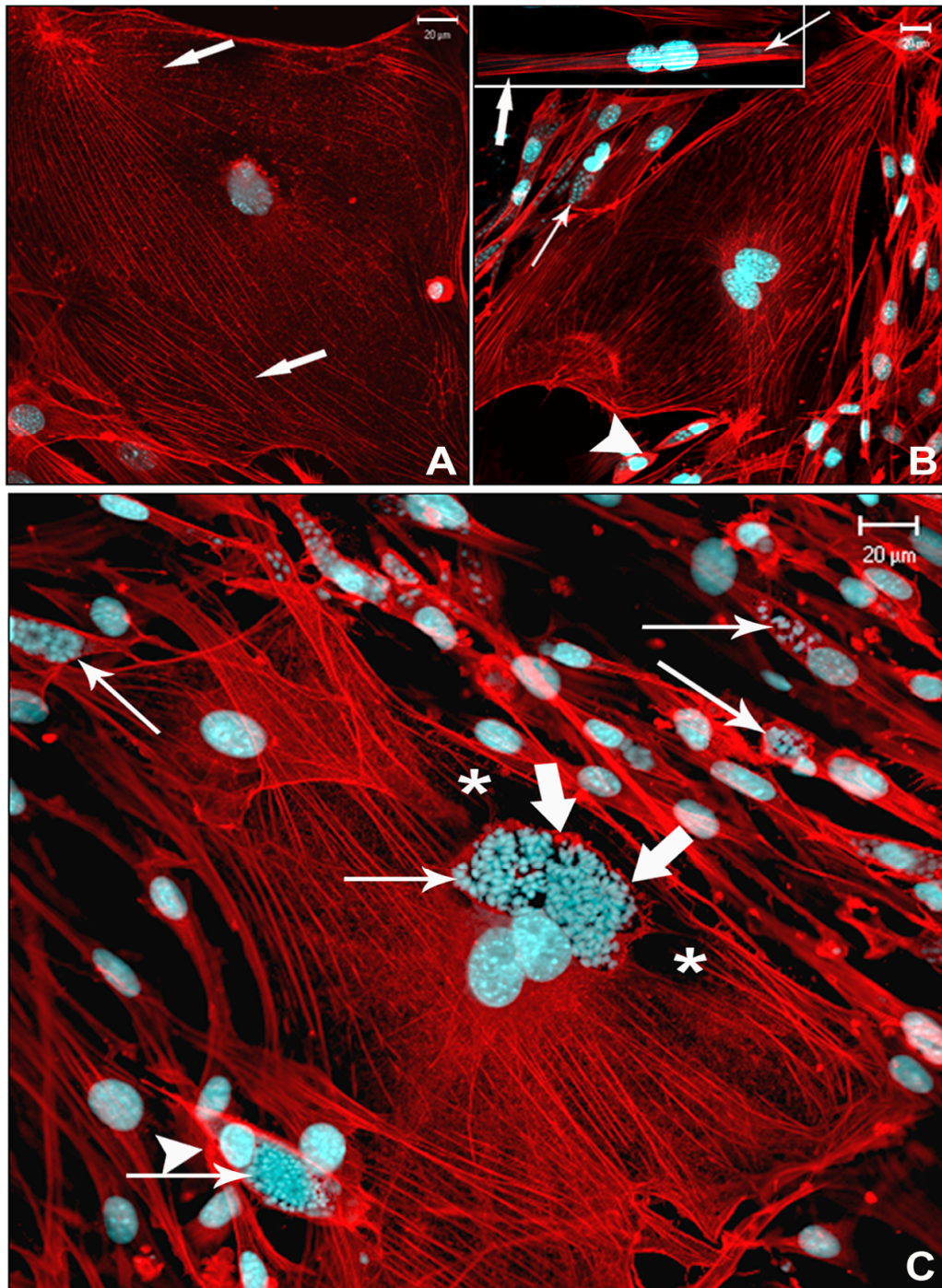


**Figura 1: Dosagem de citocinas em cultura primária de CME infectadas pelo *T. gondii* após 6, 24 e 48 h de interação.** (A) O gráfico demonstra o aumento na síntese das citocinas IL-12 em CME infectada com *T. gondii* quando comparada a células não infectadas. Note que durante o curso da infecção a diferença na produção de IL-12 entre as culturas controles e infectadas diminui. A produção de IL-12 analisada no sobrenadante de culturas infectadas foi de 3.2 vezes após 6 h de interação, seguido de 4.5 vezes após 24 h e de 4 vezes após 48 h de interação. (B) Gráfico representativo da síntese de IFN- $\gamma$  em CME infectada com *T. gondii* em relação ao controle. Note o aumento acentuado do IFN- $\gamma$  da ordem de 3.4 vezes ao longo das primeiras 24 h de interação e de três vezes ao final das 48 h. Teste t: \*  $P \leq 0,05$



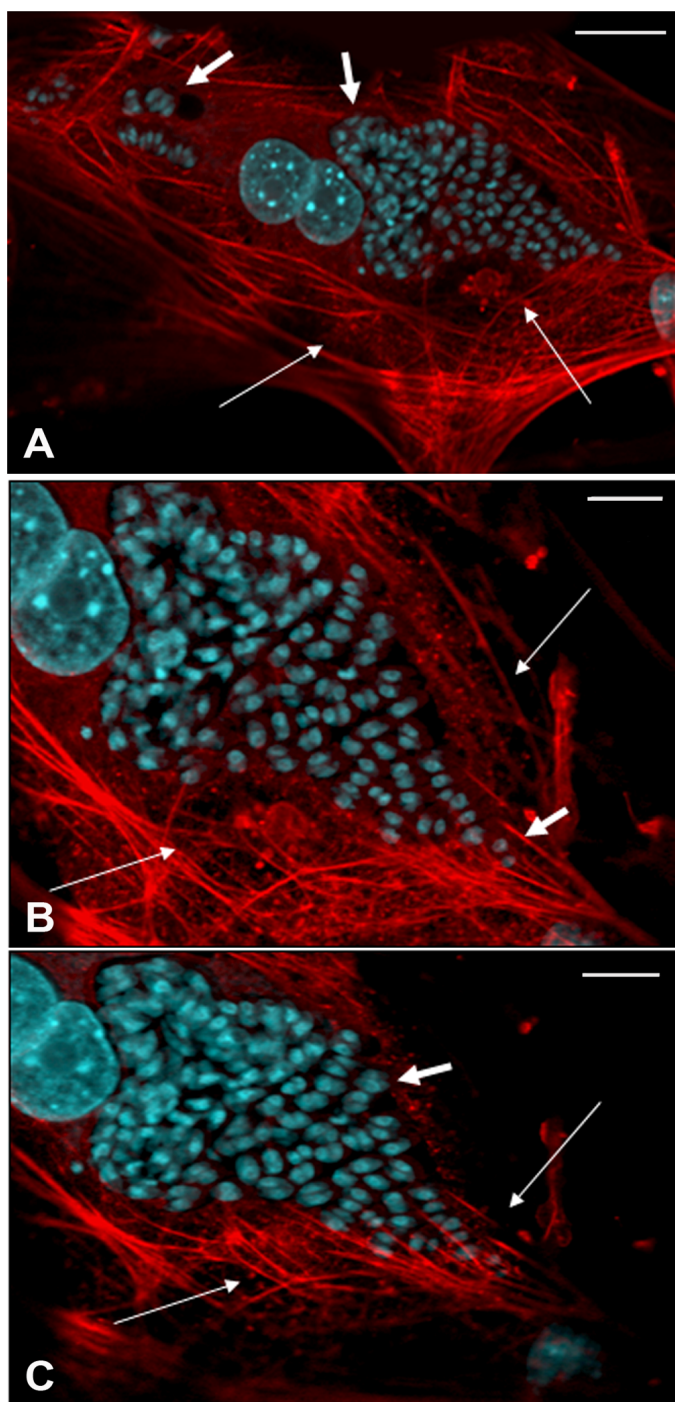
**Figura 2: Por microscopia confocal, microfilamentos de actina são revelados pela faloidina-FITC em cultura primárias de CME após 3 h de interação com o *T. gondii*.** (A) Células musculares não infectadas revelando a distribuição de actina (verde). Note que a proteína actina é encontrada preferencialmente ao longo do eixo principal da célula, formando feixes paralelos (seta grossa), e preenchendo todo o citoplasma com uma maior concentração nas extremidades e abaixo do sarcolema (seta fina). (B) Nenhuma modulação dos microfilamentos de actina é observada no momento da invasão e até 3h de infecção (setas finas). Nesse período de interação, soemnete algumas células infectadas da cultura apresentam alteração na distribuição de actina. Essas mudanças são detectadas com maior concentração de actina na periferia e ausência na região onde estão os parasitos (insert, cabeça de seta). (C) Observe o mesmo padrão de distribuição de actina em células musculares infectadas e não infectadas com o *T. gondii* após 3 h de interação (setas finas).

Todos os núcleos das células hospedeiras e parasitos foram representados em laranja para melhor visualização. Bars. 20  $\mu$ m

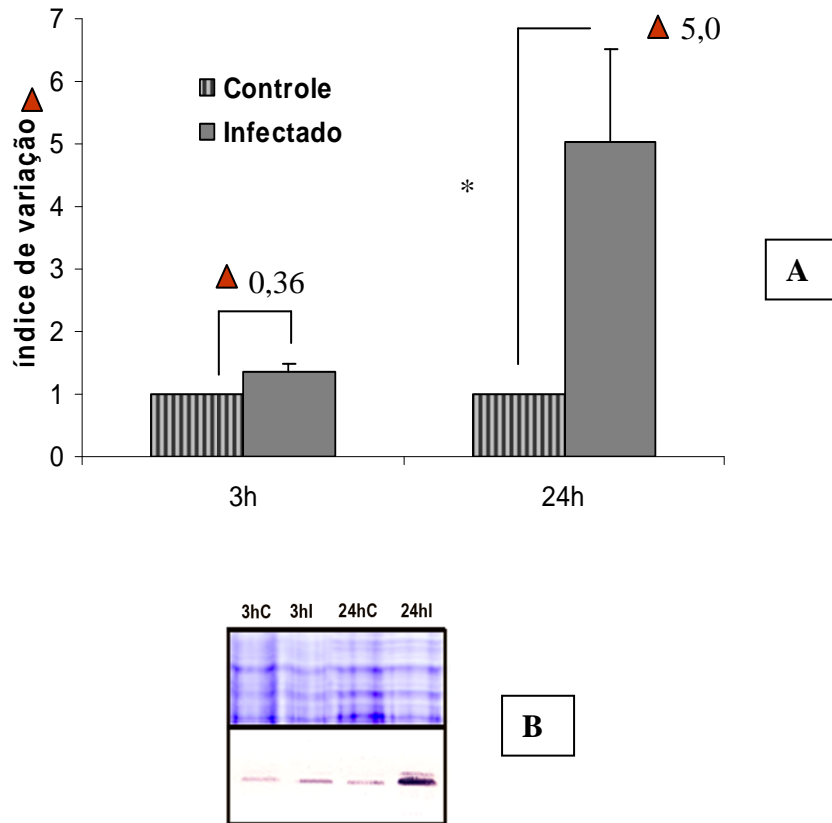


**Figura 3: Por microscopia confocal, imagens do padrão da distribuição dos filamentos de actina revelados pela faloidina-TRITC em cultura de CME infectadas pelo *T. gondii* após 24 e 48 h. (A) Em miofibroblastos não infectados, os filamentos de actina podem ser observados mais concentrados abaixo da membrana, para formar fibras de estresse e por todo o citoplasma como feixes paralelos, irradiando a partir do núcleo para a periferia da célula (setas). (B) Mesmo**

nas culturas infectadas, miofibroblastos não parasitados permanecem sem alteração na organização espacial da actina (seta grossa). Inset miotubo (seta fina) infectado com apenas um parasito mostrando microfilamentos de actina dispostos paralelamente e próximo sarcolema semelhante às células não infectadas. (C) Imagem representando o perfil da célula muscular com mais de 48 h de interação com o *T. gondii* (setas finas). Note o rompimento dos filamentos de actina próximo ao vacúolo parasitóforo (VP, asteriscos) e o acúmulo da proteína em forma de grânulos visto ao redor do VP (setas grossas). Todos os núcleos das células e dos parasitos revelados pelo DAPI estão em azul. Bars. 20  $\mu$ m



**Figura 4: Cortes seqüenciais de uma mesma célula, obtidos por microscopia confocal.** (A) Após 48h de interação, observam-se imagens sugestivas de egresso do *Toxoplasma* de miofibroblasto altamente infectado. Nota-se VP de diferentes tamanhos (setas grossas) e a desorganização completa dos microfilamentos de actina em toda a célula (setas finas). (B e C) Em maior aumento, imagens mostram em detalhes o espaçamento entre os filamentos de actina e parasitos sem evidência de membrana circundando o VP sugerindo egresso destes parasitos. Nota-se a ausência de marcação para actina em torno dos VP. Todos os núcleos de células e parasitos revelados pelo DAPI, em azul. Bars. 20  $\mu$ m



**Figura 5: Expressão de  $\alpha$ -actina de CME infectada com *T. gondii* por western blot.** (A) Nota-se que a expressão da proteína após 3 h de interação CME-*T. gondii* corresponde a um aumento de 0.36 vezes e após 24 h de infecção de 5 vezes com relação aos seus respectivos controles. (B) Imagen representando a membrana revelando a proteína  $\alpha$ -actina (C=controle e I=Infectado), e o gel “Commasie Brilliant Blue-stained”. Test t Student (\*)  $p \leq 0,05$

## DISCUSSÃO

A presente tese explorou aspectos estruturais e moleculares da interação do *T. gondii* e células musculares esqueléticas (CME), com ênfase na interferência da miogênese *in vitro* e *in vivo* frente à infecção; a participação de proteínas do citoesqueleto e adesão celular, bem como a análise da produção de corpos lipídicos (CL) e citocinas durante esta interação *in vitro*.

A miogênese de CME utilizando células embrionárias de camundongos suíços foi reproduzida, como bem estabelecido nos estudos *in vivo* e *in vitro* (Kalderon e Gilula, 1979; Araújo-Jorge e cols., 1986; Furst e cols., 1989). Em síntese, a diferenciação do músculo esquelético apresenta uma seqüência organizada de eventos, incluindo a saída do ciclo celular e a fusão de mioblastos diferenciados, para a formação de miotubos multinucleados (Araya e cols., 2004). Frente a esse sistema, o primeiro objetivo desta tese foi analisar a infecção de *T. gondii* em CME e o seu efeito no processo da miogênese.

Esse estudo resultou nas seguintes evidências: (i) mioblastos são mais susceptíveis à infecção do que miotubos e, (ii) mioblastos infectados são incapazes de se fundir com outros mioblastos e miotubos. Essas diferenças possivelmente envolvem a participação de moléculas da superfície celular de ambas as células, parasito e hospedeiro, que atuam como receptores / ligantes, tais como, proteínas de adesão intercelular com domínios Ig (I-CAM, N-CAM e V-CAM) (Hosokawa e cols., 2006; Sonnet e cols., 2006). Durante a infecção e transmigração, o *T. gondii* interage com IgCAMs através da adesão da proteína MIC2 liberada pelos micronemas, sugerindo que a capacidade infectiva do parasito é pelo menos parcialmente dependente de moléculas I-CAM presentes na superfície da célula hospedeira (Charron e Sibley, 2004). Com o intuito de monitorar ou identificar moléculas que estariam envolvidas neste processo, elegemos a molécula de adesão intercelular, a caderina, como candidata a participação no processo de reconhecimento celular e fusão dos mioblastos e miotubos (Rose e cols., 1994; Irintchev e cols., 1994; Eng e cols., 1997). Caderina pertence a uma classe de moléculas de adesão dependente de cálcio, envolvida no reconhecimento célula-célula e rearranjo celular, na morfogênese, na fusão de mioblastos e miotubos durante a miogênese, no desenvolvimento embrionário e regeneração tecidual (Kaufmann e cols., 1999; Gumbiner e cols., 2005; Kramerova e cols., 2006). Adicionalmente, tem sido estabelecido que durante a diferenciação *in vivo* de CME, ocorrem mudanças no



perfil da expressão de moléculas de adesão: N-CAM e V-CAM, assim como, da M-caderina (“M” de músculo) que é encontrada em concentração mais alta em mioblastos do que em miotubos e fibras musculares adultas (Levi, 1993; Levi e cols., 1993; Irintchev e cols., 1994; Eng e cols., 1997; Jesse e cols., 1998; Curci e cols., 2008). Esses dados sugerem que os resultados apresentados aqui, apontando diferenças de susceptibilidade de mioblastos (61%) e miotubos (38%) de culturas primárias de CME à infecção pelo *T. gondii*, podem estar relacionadas ao remodelamento das moléculas de adesão na superfície da célula hospedeira durante a sua diferenciação. Esses resultados abrem novas perspectivas para um estudo direcionado visando identificar, o papel da caderina como mediadora do processo de invasão celular pelo *T. gondii* em CME e em outros tipos celulares.

A investigação da participação da caderina no processo da miogênese demonstrou, por microscopia confocal, a distribuição desta molécula em toda a superfície dos mioblastos, em mioblastos alinhados e principalmente, no ponto de contato célula-célula. Em miotubos jovens e maduros, as moléculas de caderina foram reveladas no sarcolema, mais especificamente nos pontos de inserção com mioblastos e/ou outros miotubos, como previamente demonstrado por outros autores Rose e cols. (1994); Irintchev e cols. (1994); Eng e cols. (1997); Jesse e cols. (1998); Kaufmann e cols. (1999) e Curci e cols. (2008). Em todas as CME (mioblastos e miotubos), nenhuma mudança foi observada com relação ao padrão de distribuição da caderina nas primeiras 3h de interação com o *T. gondii*. No entanto, a infecção por mais de 24h resultou no rompimento da junção celular mediada pela caderina, apresentando um declínio acentuado no *pool* total da proteína, indicativo de que o parasito modulou negativamente a expressão da molécula na superfície de células infectadas. Esses resultados obtidos por microscopia confocal, agregando as imagens que demonstram as moléculas de caderina ao redor e no interior do vacúolo parasitóforo, abrem novas perspectivas para o estudo da participação desta proteína na adesão e o seu destino intracelular durante a infecção de *T. gondii* em células musculares. Esse estudo se reveste de importância dado o envolvimento da célula muscular na fase crônica da infecção, permitindo explorar se essa interação molecular ocorre com outros tipos celulares, não envolvidos com a fase crônica da infecção.

Nossos resultados corroboram achados anteriores demonstrando que os anticorpos contra a proteína caderina reconheceram a mesma proteína de 130 kD (Eng e cols., 1997). A redução de 10% na síntese de caderina, entre o segundo e o

terceiro dias de plaqueamento, pode ser justificada considerando-se que neste período, a maioria dos mioblastos já concluiu seu programa de proliferação e de reconhecimento celular (Donalies e cols., 1991). Desta forma, a infecção no segundo dia de cultivo das CME permitiu o estudo do papel do Toxoplasma na modulação da caderina e inibição da miogênese.

Confirmando nossos resultados por imunofluorescência, as análises por "western blot" mostraram que não houve alteração nos níveis da proteína caderina em mioblastos e miotubos recém infectados (dados não mostrados). Após 24h de interação com *T. gondii*, a presença do parasito reduziu em mais de 50% a expressão da caderina. Como consequência dessa modulação negativa, a fusão de membranas para a formação de células multinucleadas foi seriamente prejudicada, obtendo-se inibição da miogênese, que alcançou níveis de 75%.

Em relação a esta modulação negativa da expressão da proteína caderina, observado por imunofluorescência e "western blot", após 24h de interação CME-*T. gondii*, um fator responsável que pode ser considerado é a ativação dos sistemas proteolíticos. Sabe-se que, durante o ciclo lítico do *T. gondii* sistemas proteolíticos podem ser ativados por moléculas envolvidas no processo de fusão, incluindo os íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (Gail e cols., 2001; Arrizabalaga e Boothroyd, 2004). Trabalhos anteriores mostraram que, em resposta ao aumento citoplasmático de  $Ca^{2+}$  há um aumento da atividade das calpaínas que está envolvida em muitos eventos biológicos, incluindo a migração celular e diferenciação da célula muscular (Delgado e cols., 2001, Glading e cols., 2002, Liu e cols., 2003; Dedieu e cols., 2004). Assim, sugerimos que em CME infectadas por Toxoplasma, a degradação da proteína caderina, observada em todos os nossos experimentos, pode ser dentre outros fatores, devido à modulação dos níveis de  $Ca^{2+}$  o que levaria a um aumento da atividade proteolítica da calpaína-3, que é reconhecida por atuar diretamente na degradação da proteína M-caderina (Dedieu e cols., 2004, Raynaud e cols., 2004; Kramerova e cols., 2006).

Através de diferentes metodologias, tanto estruturais como moleculares, demonstramos que a molécula caderina é negativamente modulada durante infecção inibindo a miogênese de CME. Desta forma resolvemos analisar a expressão do mRNA para a M-caderina por RT-PCR durante interação considerando: (i) nosso modelo celular ser embrionário; (ii) a especificidade da M-caderina durante a embriogênese, ser restrita às células originadas dos somitos comprometidas com a linhagem muscular (Rose e cols., 1994) e, (iii) por ser encontrada em grande

quantidade em células satélites e mioblastos, desempenhando papel fundamental na miogênese (Moore e Walsh, 1993; Kaufmann e cols., 1999; Charrasse e cols., 2006; Hsiao e Chen, 2010). Nossos resultados mostraram que em culturas não infectadas, o mRNA para M-caderina foi regulado positivamente até dois dias após o plaqueamento (correspondente ao período de indução da fusão), diminuindo sua expressão no terceiro dia de cultivo (Rose e cols., 1994; Eng e cols., 1997; Kaufmann e cols., 1999). Em CME infectados com *T. gondii*, após 3h e 24h de infecção os níveis do mRNA da M-caderina mostraram uma redução significativa.

Acreditamos que o *T. gondii*, assim como outros parasitos, possam se beneficiar da modulação negativa da caderina e de outras moléculas de adesão, para facilitar a migração para outras células e tecidos vizinhos. Tem sido descrito que vários outros patógenos intracelulares, tais como *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri*, *Trypanosoma cruzi* e *Chlamydia trachomatis* podem modular moléculas de adesão tais como: E-caderina, claudina-1, ZO-1, N-caderina e nectina-1 comprometendo assim as junções aderentes durante o processo infeccioso (Terres e cols., 1998; Yu e cols., 2011; Bebb e cols., 2006; Sakaguchi e cols., 2002; Soler e cols., 2001; Melo e cols., 2008; Sun e cols., 2008). No entanto, isso nem sempre é um comportamento consistente. Por exemplo, foi observado que em células satélites musculares infectadas pela *Trichinella pseudospiralis*, a M-caderina foi regulada positivamente (Wu e cols., 2008). Desta forma, sugerimos um papel funcional da caderina no processo infeccioso por patógenos em diferentes tipos celulares (Wu e cols., 2008).

Estudos recentes revelam que proteínas das róptrias atuam como quinases e fosfatases manipulando a via sinalizadora do hospedeiro, infiltrando-se no núcleo da célula (De Souza e cols., 2009; Jan e cols., 2009). Assim, sugerimos que a regulação negativa do mRNA de M-caderina em CME possa ser decorrente da capacidade que o *Toxoplasma* possui de alterar a transcrição de genes da célula hospedeira. Semelhante ao que foi descrito por Melo e cols. (2008), a diminuição da expressão da caderina desestabiliza as áreas de contato entre as células musculares, promovendo a instabilidade das junções, comprometendo a formação e homeostase do músculo. Durante o desenvolvimento embrionário as caderinas participam de forma direta do processo de reconhecimento celular para a formação dos tecidos (Rose e cols., 1994; Kaufmann e cols., 1999). Desta forma acreditamos que nossos resultados *in vitro* possam contribuir para uma nova investigação da infecção congênita pelo *Toxoplasma* durante a embriogênese do tecido muscular.

Além das moléculas de adesão, o citoesqueleto também participa do processo de formação e estabilidade das células e tecidos através das junções aderentes. Como descrito, as caderinas formam ligações-chave entre si e se interconectam com o citoesqueleto de actina e microtúbulos de células vizinhas (Mège e cols., 2006). Desta forma, em decorrência da modulação da caderina pelo *T. gondii* descrita aqui e a sua estreita relação com o citoesqueleto (Yap e cols., 1997; Kaufmann e cols., 1999; Meng e Takeichi, 2009), resolvemos investigar também a interferência do parasito na citoarquitetura de CME durante a sua interação com *T. gondii*.

Para iniciar esse estudo foi desenvolvido um desenho experimental para análise quantitativa da infecção, utilizando-se a relação parasito-CME de 5:1, que gerou a infecção de 80% das células após 2h de interação e mais de 90% após 24h, as quais apresentavam pelo menos um parasito interiorizado. Essa infecção, foi bem representativa da infectividade que se refletiu no número médio de parasitos por célula infectada da ordem de 3.5 e de 7.3, após 2 e 24 h de interação, respectivamente. Assim, nosso sistema garantiu a integridade das células durante todo o curso da interação CME-*T. gondii*.

O envolvimento dos microtúbulos no processo de invasão pelo *T. gondii* tem sido recentemente descrito (Sweeney e cols., 2010). No presente estudo, a avaliação por microscopia confocal da cinética da participação dos microtúbulos durante a interação demonstrou que estes filamentos permaneceram abundantes na grande maioria das células: infectadas ou não pelo *T. gondii*. A alteração detectada pela presença do parasito na CME, ficou restrita à distribuição espacial dos microtúbulos que foi revelada em torno do vacúolo parasitóforo (VP) a partir de 3h, intensificando-se com 24h de interação, o que confirma as observações de Andrade e cols. (2001). Assim, acumulamos evidências de que não houve quebra ou degradação dos microtúbulos e sim um novo remodelamento desses filamentos no interior da célula infectada. Estudos mostram que as mudanças no crescimento do VP são dinâmicas e que um vacúolo pode aumentar sua área de superfície quatro vezes e o seu volume até oito vezes dentro das primeiras 24h de infecção com o *T. gondii* (Sinai, 2008). Desta forma, acreditamos que o remodelamento dos microtúbulos ao redor do PV nas CME infectadas pelo *T. gondii* não esteja relacionada somente com a aquisição de nutrientes pelo parasito (Coppens e cols., 2006), mas também que atue como uma forma de estabilização estrutural da membrana do VP (Andrade, 2001; Sinai, 2008; Walker e cols., 2008). Além disso, os microtúbulos parecem contribuir com a nova distribuição das organelas no interior da célula infectada, como retículo

endoplasmático e mitocôndria durante a replicação do parasito, servindo para estabilizar e preservar esse nicho (Andrade e cols., 2001; Melo e cols., 2001; Sinai, 2008).

A escolha da miosina incluída neste estudo, se justifica pela mesma estar envolvida no processo de diferenciação e maturação de miotubos através do processo da miofibrilogênese. Durante a diferenciação ocorre uma distribuição progressiva de miosina formando as bandas A dos sarcômeros, conferindo um perfil estriado às CME (Sanger e cols., 2010). A análise dos resultados obtidos durante o presente estudo sugere que a infecção pelo *T. gondii* interfira no processo da miofibrilogênese. Essa sugestão deriva de que com 3h de interação foi observada uma marcação dispersa e nenhum perfil estriado, que é conferido pela miosina, na região da célula infectada, onde se localizavam os parasitos. Após 24h, a presença maciça dos parasitos levou a uma total desorganização das miofibrilas reveladas pelo anticorpo anti-miosina esquelética. Aparentemente, algumas miofibrilas foram deslocadas em direção ao sarcolema, e outras foram localizadas ao redor dos vacúolos. Além disso, a presença da marcação da miosina ao redor dos VP sugere que esta proteína possa estar sendo também recrutada pelo *Toxoplasma* já nos estágios iniciais da infecção, à semelhança do que ocorre com os microtúbulos durante a interação CME-*T. gondii*. Conforme descrito por Pizon e cols. (2005), os microtúbulos parecem conduzir a miosina durante a formação e alinhamento dos sarcômeros. Portanto, sugerimos que o recrutamento de microtúbulos pelo *T. gondii* também possa modular a disposição da miosina durante o processo de miofibrilogênese. Desta forma, durante o curso da infecção com a multiplicação intensa dos parasitos e subsequente egresso da célula hospedeira, a reconstituição das miofibrilas poderia ser afetada por uma desorganização das proteínas envolvidas neste processo.

Alterações estruturais nas miofibrilas tem sido relacionadas com o desenvolvimento de miopatias, como por exemplo, as desminopatias (Schröder e Schoser, 2009). Nossos estudos mostram que no tecido muscular esquelético esses distúrbios podem ser causados (dentre outros patógenos), pelo *Toxoplasma*. Por microscopia confocal foi detectada uma diminuição expressiva na marcação para desmina, proteína músculo específica dos filamentos intermediários (FIs), em CME infectada pelo *T. gondii*. Este resultado inesperado foi confirmado por “immunoblotting” onde se verificou uma redução de 71% e 70% na expressão de desmina para os tempos de interação de 3 e 24h, respectivamente. Estes dados nos

permite concluir que a regulação negativa da desmina (vista por imunofluorescência), quanto a diminuição da sua expressão em CME infectada pelo *T. gondii*, foi devida a degradação da proteína. Essa conclusão tem apoio no fato de que não foram observadas mudanças significativas na expressão do mRNA para desmina pelo método de RT-PCR.

A reorganização dos FIs pelo *Toxoplasma* foi demonstrada em outros modelos celulares, mas nenhum decréscimo na expressão de proteínas que constituem esses filamentos tem sido investigada (Laliberté e Carruthers, 2008). Estudos mostram o envolvimento dos FIs de desmina na integridade das células e alinhamento dos seus núcleos, através de sua conexão estável com outras moléculas na sua superfície, assim como, no sarcolema (Mermelstein e cols., 2006; Schröder e Schoser, 2009). Desta forma, a falta de alinhamento dos núcleos observada aqui em algumas células infectadas, poderia ser explicada pela diminuição da expressão de desmina causada pelo *Toxoplasma*, como demonstrado também por Western blot. Dentre as moléculas participantes da diferenciação das células musculares esqueléticas estão as enzimas proteolíticas do sistema calpaína (Moyen e cols., 2004). Apesar da participação destas enzimas e de outras proteases no curso da miogênese, o *T. gondii* desenvolveu mecanismos de proteção contra a ação de proteases da célula hospedeira, como por exemplo, através da secreção do inibidor serino-protease I de *T. gondii*, secretado pelos grânulos densos, modulando a resposta imune durante a fase aguda da infecção, como preconizado por Pszeny e cols. (2002). Esse conjunto de dados nos permite inferir que esta degradação da desmina possa estar diretamente relacionada com a sensibilidade desta proteína à ação dos sistemas proteolíticos da célula hospedeira, sem afetar o parasito, tal como proposto por Goll e cols. (2003). Contudo, as possíveis mudanças induzidas pelo *T. gondii* em CME, levando à ativação desses sistemas proteolíticos, devem ser ainda investigadas.

Em função da estreita relação existente entre os componentes do citoesqueleto de CME durante a miofibrillogênese (Costa e cols., 2004; Sanger e cols., 2010), o que estamos discutindo aqui, infere que a degradação de desmina deve estar favorecendo um novo remodelamento de microtúbulos e miosina nessas células. Esse evento, dentre outros, poderia explicar as mudanças morfológicas sofridas pelas CME após interação com o *Toxoplasma*, como descrito no presente trabalho. Experimentos com ratos nocaute para desmina apresentaram alterações nas células musculares e na sua citoarquitetura devido à falta de ancoragem miofibrilar com o sarcolema (Li e cols., 1997; Capetanaki e cols., 2002; Shah e cols., 2004; Schröder e

Schoser, 2009). Assim, a degradação da desmina e as alterações em cadeia de outras proteínas do citoesqueleto sugerem a hipótese de que esses eventos poderiam facilitar o ciclo lítico e o deslocamento do *T. gondii* em CME. As principais mudanças na citoarquitetura de CME que ocorreram durante a infecção pelo *T. gondii*, coincidem com a replicação ativa e egresso dos parasitos. Esses dados sugerem que o *T. gondii* tenha uma estratégia para romper as barreiras físicas do citosol e das membranas celular e do vacúolo parasitóforo, objetivando alcançar o meio extracelular e obter êxito para concluir o seu ciclo lítico e expandir a infecção, invadindo novas células.

A cinética de infecção de células hospedeiras pelo *T. gondii* mostra que após 48h de infecção, o Toxoplasma evade das mesmas levando à lise da membrana (Arrizabalaga e Boothroyd, 2004). O egresso requer que os parasitos organizados em forma de roseta se separem uns dos outros para atravessar a membrana do vacúolo parasitóforo, no citosol, a malha do citoesqueleto da célula hospedeira e finalmente a membrana plasmática, para atingir o espaço intercelular (Caldas e cols., 2010). Em algumas células da cultura observamos que após 48h de interação, o *T. gondii* não completou seu ciclo lítico permanecendo intracelular. Nesta linha, nossos dados apontam para a participação dos filamentos de actina neste processo não só em mioblastos, mas também em miofibroblastos. Essas últimas células têm um papel importante na síntese e reorganização da matriz extracelular e em processos de cicatrização tecidual (Serini e Gabbiani, 1999). Além disso, os miofibroblastos são células comuns do tecido muscular e muito maiores, possibilitando uma melhor demonstração do comportamento da actina durante interação com *T. gondii*. Para isso, as culturas de CME infectadas pelo *T. gondii* foram marcadas com faloidina acoplada ao fluorocromo TRITC ou FITC, para uma melhor avaliação da distribuição dos microfilamentos de actina em todas as células em cultura. A maioria dos estudos concentra a atenção em torno da invasão, objetivando esclarecer a participação de elementos do citoesqueleto da célula hospedeira nestes processos com diferentes patógenos intracelulares (Nogueira e Cohn, 1976; Schenckman e Mortara, 1992; Barbosa e Meirelles, 1995; Finlay e Cossart, 1997; Carvalho e cols., 1999). No entanto, nenhuma modulação dos microfilamentos de actina foi observada no momento da invasão de *T. gondii* até 3h da infecção. Ao contrário de outros patógenos como, por exemplo, o *T. cruzi* (Pereira e cols., 1993; Carvalho e cols., 1999), observamos que a modulação da actina globular ou a filamentosa foi tempo e número de parasito-dependente.

Em mioblastos e miotubos não infectados, a proteína actina foi visualizada preferencialmente ao longo do eixo principal da célula, formando feixes paralelos e preenchendo todo o citoplasma com uma maior concentração nas extremidades e abaixo do sarcolema (Clark e cols., 2002; Sanger e cols., 2010). Já nos miofibroblastos, os filamentos de actina foram observados mais concentrados na região abaixo da membrana, formando fibras de stress e por todo o citoplasma, como feixes paralelos, irradiando a partir do núcleo para a periferia da célula (Gailit e cols., 2001; Pereira e cols., 2004). Algumas células da cultura, após 48h de interação com *T. gondii*, mostraram uma drástica mudança no perfil de marcação para actina. Houve uma maior concentração em forma de grânulos, ao redor do VP e também rompimento dos filamentos de actina. De destaque, foi a presença de parasitos ainda dispostos sob a forma de roseta e sem qualquer evidência estrutural de egresso. Até o momento, nós não temos conhecimento de estudos demonstrando a reorganização de filamentos de actina em torno de patógenos intracelulares (Pereira e cols., 1993; Carvalho e cols., 1999; Laliberté e Carruthers, 2008). No caso do *Cryptosporidium* sp um parasito também do filo Apicomplexa é descrito que durante a invasão e estágio intracelular, ocorre a formação de uma placa de actina na interface de adesão à membrana da célula hospedeira, que se mantém por todo o ciclo intracelular do parasito, como demonstrado por Elliott e Clark (2000). Na nossa avaliação existem duas hipóteses que poderiam justificar o aumento da síntese de actina e seu acúmulo em torno do vacúolo em miofibroblastos: (i) estas células funcionariam transitoriamente como repositórias de parasitos, constituindo um pool para posterior infecção de novas células nos sistemas *in vivo* e *in vitro* e, (ii) o recrutamento de actina e seu acúmulo ao redor do vacúolo, podem estar sinalizando o processo de modificação da membrana do VP (MVP) para o estabelecimento da cistogênese.

Em outras células da cultura foi possível verificar imagens sugestivas de egresso destes parasitos, pela visível desorganização destes microfilamentos na região de escape. Os eventos estruturais com relação à citoarquitetura da célula hospedeira durante o escape do parasito têm sido pouco explorados e no presente trabalho nós demonstramos que filamentos de actina são desorganizados ao longo desse processo, tanto em miofibroblastos quanto em mioblastos. A travessia do parasito pelo citoplasma da célula hospedeira é descrita como um evento traumático, que conduz ao processo de lise celular (Black e Boothroyd, 2000).

Apesar da visível desorganização dos filamentos de actina em algumas células da cultura infectadas pelo *T. gondii*, tanto por esgarçamento dos filamentos de actina,



como por seu acúmulo ao redor do vacúolo, nossos ensaios bioquímicos mostraram um aumento significativo da  $\alpha$ -actina (abundante na CME), após 3 e 24h de interação. Estudos mais aprofundados da expressão do mRNA para  $\alpha$ -actina em CME se tornam necessários a fim de confirmar o papel do *T. gondii* na modulação desta proteína e sua possível participação no desenvolvimento da cistogênese.

Em conclusão, os dados apresentados nesta tese mostram evidências de mudanças na citoarquitetura de CME induzidas durante a infecção pelo *T. gondii*. Nós sugerimos que o parasito possa estar manipulando as vias de sinalização da célula hospedeira pela ativação de seus sistemas proteolíticos. Este mecanismo poderia atuar primariamente na degradação da desmina, com conseqüente rompimento dos microfilamentos de actina e remodelamento dos microtúbulos e miosina. A degradação da desmina, observada nos ensaios por imunofluorescência e demonstrada pela análise bioquímica, com o rearranjo dos microtúbulos e dos filamentos de miosina facilitariam o deslocamento do parasito no interior de CME durante o seu ciclo lítico.

Tem sido demonstrado que a formação e manutenção de células de tecido embrionário requerem a participação de proteínas de adesão e sua associação estável com o citoesqueleto de células vizinhas (Yap e cols., 1997; Kaufmann e cols., 1999; Meng e Takeichi, 2009). Essa interação constitui importantes estruturas na formação e estabilidade das células e tecidos - as junções aderentes (Harris e Tepass, 2010). Estas junções são particularmente importantes para a regulação da dinâmica de diversos processos morfogenéticos (Gumbiner, 2005). Desta forma, a inibição da miogênese de CME embrionárias pela infecção do *T. gondii*, observada em nossos experimentos *in vitro*, abre novas linhas de investigação com relação ao comprometimento deste tecido em indivíduos com toxoplasmose congênita.

A toxoplasmose congênita é uma das mais sérias conseqüências da infecção aguda causada pelo *Toxoplasma*, sendo que a sua maior gravidade é observada no início da gestação, como demonstrado experimentalmente no presente trabalho. Utilizando camundongos suíços, na primeira semana de gestação e infectados com *T. gondii*, nós observamos além do óbito de algumas fêmeas: reabsorção fetal, abortos e natimortos com uma taxa de perda de mais de 50% para o grupo 1 (inoculadas com 25 cistos) e de quase 100% no grupo 2 (inoculadas com 50 cistos). Esses dados confirmam que a gravidade da infecção pelo *Toxoplasma* nas fêmeas e nos embriões depende da concentração de parasitos, no nosso caso de cistos inoculados, que corresponderia à reprodução da infecção que ocorre durante a

transmissão do parasito na natureza, pela ingestão de carne crua ou mal cozida contaminada com estes cistos (Dubey, 2004). O comprometimento no desenvolvimento dos embriões de mães infectadas pelo *Toxoplasma* foi incontestável, com imagens macroscópicas evidenciando claramente a má formação dos membros anteriores e posteriores, além de outras más formações, corroborando os dados de Stahl e cols. (2004). Do ponto de vista do objetivo deste trabalho, os resultados obtidos ratificam os dados obtidos durante a miogênese de CME *in vitro*.

A patogenicidade do *T. gondii* é determinada por muitos fatores como: susceptibilidade da espécie hospedeira, estágio da infecção (agudo ou crônico) e virulência da cepa do parasito (Dubey, 2004). A resposta inflamatória sistêmica induzida pelo parasitismo (sepsis toxoplásmica), como observado em nossos experimentos, pode ter gerado a falência múltipla dos órgãos destes embriões, como proposto anteriormente por Stahl e cols. (2004). Apesar da já conhecida participação do tecido muscular no desenvolvimento da fase crônica da Toxoplasmose (Remington e Cavanaugh, 1965), nenhum estudo envolvendo embriões com TC descreveu a influência do parasito no desenvolvimento do tecido muscular. O tecido muscular de embriões com TC, quando comparados com o músculo sadio, apresentou menor densidade de miofibras e maior espaço interfibrilar, preenchido por células do tecido conectivo e provavelmente células mononucleares de infiltrado inflamatório, tais como: macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos (Tonino e cols., 1996; Hasene e cols., 2008). Além da escassez de miofibras e principalmente miofibras maduras, o tecido muscular analisado de embriões com TC, apresentou várias células bipolares com núcleos pequenos e alongados, caracterizando mioblastos, provavelmente ainda em processo de alinhamento e fusão. Miofibras de embriões murinos com TC apresentaram além de tamanho reduzido e menor densidade de material citoplasmático (caracterizado por uma leve coloração pela HE), discreto perfil estriado, sendo células aparentemente imaturas com poucos núcleos e descontínuas, influenciando no seu comprimento. Em um embrião sadio, o tecido muscular apresenta muitas células satélites aderidas à miofibras, mioblastos em processo de fusão e miofibras maduras alinhadas paralelamente de forma densa e contínua (Tajbakhsh, 2009). Pela técnica de coloração histológica HE foi possível observar miofibras bem definidas com estriações características deste tipo celular, denso material citoplasmático e maior proximidade entre as mesmas. Supomos que esta densidade citoplasmática, caracterizada pela coloração intensa das miofibras, possa estar associada a um maior processo de fusão no início do desenvolvimento

da fibra muscular. No entanto, já se sabe que o *T. gondii* pode causar miosites, quer por infecção recente ou reativação dos cistos teciduais comprometendo a homeostase do tecido muscular (Hasene e cols., 2008). Estudos histopatológicos mais aprofundados estão sendo realizados, considerando-se que nossas análises preliminares apontaram claramente que embriões de uma mesma ninhada tiveram influência diferenciada no grau de comprometimento do desenvolvimento embrionário induzido pelo Toxoplasma. Nesta linha, faz-se necessário um estudo mais sistematizado quanto ao processo de formação do tecido muscular de embriões murinos com TC, como por exemplo, a exploração de proteínas diretamente envolvidas neste processo, incluindo as proteínas de adesão e do citoesqueleto, importantes como já discutimos, na formação e estabilidade do tecido muscular (Harris e Tepass, 2010).

Na presente tese, além do novo remodelamento do citoesqueleto das CME durante a sua interação com o *T. gondii*, foi demonstrado também a participação de organelas da célula hospedeira na manutenção do VP. É conhecido que o *T. gondii* mobiliza fontes de lipídios da célula hospedeira durante a sua invasão e seu ciclo intracelular (Charon e Sibley, 2002), e que o parasito não sintetiza seu próprio colesterol, mas o obtém da célula hospedeira (Coppens e cols., 2000; Portugal e cols., 2008). Além de retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias, como tem sido descrito desde os primeiros estudos da interação *T. gondii*-célula hospedeira por Jones e cols. (1972), nossa investigação mostra adicionalmente, o envolvimento de corpúsculos lipídicos (CL) neste processo. Esses CL podem ser identificados por microscopia de luz e fluorescência usando corantes específicos e também por microscopia eletrônica (Argermüller e Fahimi, 1982; Weller e cols., 1991; Melo e cols., 2011), o que possibilita também estudos quantitativos. A interação de CL com o parasito intracelular foram visualizados por confocal com o corante "Nile Red", já nas primeiras horas de infecção e com 24 horas, o recrutamento de CL em torno dos vacúolos parasitóforos foi observado. A análise quantitativa de células infectadas e não infectadas marcadas por BODIPY, demonstrou claramente uma resposta celular de CME à presença de *T. gondii*. Essa resposta envolveu uma rápida formação de CL sugerindo que o parasito possa interferir no metabolismo lipídico de CME, estimulando assim, a sua síntese. Estudos anteriores mostram o seqüestro de alguns fosfolipídios pelo *T. gondii* durante sua estada na célula hospedeira para a construção de lipídios mais complexos (Charron e Sibley, 2002). Em nossos experimentos foi observado que nas células infectadas pelo *T. gondii* ocorre aumento

significante na produção de CL em todos os tempos de interação: 6, 24 e 48h. É conhecido que células musculares apresentam os principais fosfolípidios em CL, tendo um papel importante na regulação do ciclo celular, migração e miogênese através da ativação de sistemas proteolíticos, como por exemplo, o sistema calpaína (Delgado e cols., 2001; Glading e cols., 2002; Liu e cols., 2003; Dedieu e cols., 2004). Desta forma, nós não descartamos a hipótese de que o recrutamento dos CL pelo parasito, durante o seu período de replicação, desencadeie um aumento na síntese destes corpúsculos pelas CME, a fim de garantir a homeostase de suas atividades vitais.

A análise dessas células infectadas, empregando os recursos da citoquímica ultraestrutural, demonstrou pela primeira vez, o direto contato de CL com a membrana vacuolar, sua matriz, e a membrana do parasito durante sua segregação no interior do VP. Estruturalmente, os CL são osmiofílicos e consistem de um núcleo de ésteres de colesterol e triglicerídeos circundados por uma camada única de fosfolípidios (Tauchi-Sato e cols., 2002; Bozza e cols., 2009). Nós acreditamos que este recrutamento de CL pelo *T. gondii* deve estar envolvido com a deficiência do parasito em sintetizar colesterol e outros lipídios. Contudo, a célula hospedeira necessita de colesterol para suas atividades vitais. Para isso, a homeostase é mantida pelo balanço entre o colesterol interiorizado via receptor LDL e a síntese envolvendo a enzima 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-CoA) redutase (Goldstein e Brown, 1990). Já em células infectadas pelo *T. gondii*, é descrito que ocorre um aumento na síntese de receptores para interiorização de LDL (Coppens e cols., 2000) e a atividade de HMG-CoA redutase fica quatro vezes mais alta (Blader e cols., 2001). Desta forma acreditamos que a CME, aumente a síntese os CL de forma a compensar o seqüestro destas estruturas pelo *T. gondii*, observado em nossos experimentos.

O crescimento gradual da área da membrana do vacúolo, onde o *T. gondii* reside, é parcialmente devido à incorporação de elementos do retículo endoplasmático (RE) no VP (De Melo e De Souza, 1997; Sinai e cols., 1997). Estudos mostram o envolvimento do RE da célula hospedeira na síntese de CL (Bozza e cols., 2009). Este suplemento de lipídios poderia contribuir para o aumento da área da membrana do vacúolo durante o desenvolvimento intracelular do *T. gondii*, como proposto anteriormente por De Melo e De Souza (1997); Sinai e Joiner (1997; 2001) e Sinai e cols. (1997). O mecanismo pelo qual os lipídios derivados da célula hospedeira são transferidos através da membrana do vacúolo parasitóforo é

ainda incerto (Charron e Sibley, 2002). Nossos dados claramente demonstraram: (i) a descarga do retículo sarcoplasmático (RS) para o interior do VP após 4h de infecção CME-*T. gondii* e; (ii) a presença de vesículas com diferentes diâmetros e morfologias contendo produto de reação para IK localizado dentro do vacúolo após 24h de infecção. Esses resultados são similares aqueles descritos por Goldszmid e cols. (2009) que observaram por imunocitoquímica ultraestrutural a transferência de componentes de RE para dentro do VP, indicando que ocorre a fusão entre os dois compartimentos e ainda, (iii) o acentuado decréscimo da marcação do RE em torno do VP, após 24h de infecção. Esses dados sugerem que componentes do RE podem estar sendo incorporados pelos parasitos intracelulares, constituindo uma fonte de nutrientes e lipídios possivelmente para seu desenvolvimento, como proposto anteriormente (De Melo e De Souza, 1992, 1997; Charron e Sibley, 2002; Goldszmid e cols., 2009).

O RE tem um papel crucial na sinalização citoplasmática em uma variedade de células. Isto é particularmente relevante para CME, onde o RS constitui o principal estoque de  $Ca^{2+}$  para funções essenciais, tais como, a contração celular (Franzini-Armstrong e Protasi, 1997; Puzianowska-Kuznicka e Kuznicki, 2009). Nossos resultados por microscopia eletrônica demonstraram total reorganização do RS em CME infectadas pelo *T. gondii*. Então, nós acreditamos que esse fenômeno deve levar às mudanças na homeostase de  $Ca^{2+}$  comprometendo a funcionalidade das CME. Rossi e cols. (2009) descreveram a importância da justa posição do RS, mitocôndria e túbulos transversos (túbulos T) na célula muscular para melhorar a comunicação entre os sítios de liberação de  $Ca^{2+}$  que permite a contração das miofibrilas. Assim, nós sugerimos que o *T. gondii* deve ser beneficiado pelo reposicionamento do RS seqüestrando não somente lipídio, mas também o  $Ca^{2+}$  não utilizado pelos sarcômeros.

Recentemente foi descrita a acumulação de CL dentro de leucócitos em condições inflamatórias, por exemplo, nas sépsias bacterianas, inflamação pulmonar alérgica, artrites e em infecções micobacterianas, dentre outras (Bozza e cols., 2009). Contudo, os mecanismos que regulam a formação de CL e sua significância funcional para a biologia celular na infecção pelo *T. gondii* não são ainda conhecidos.

Vários estudos mostram que: (i) o aumento no número de CL produzidos durante infecções está relacionado com a geração de eicosanóides (Dvorak e cols., 1983; Bozza e cols., 1997; Pacheco e cols., 2002; Melo e cols., 2003; D'Avila e cols., 2006); (ii) a produção de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) é uma consequência da indução

do gene ciclooxygenase-2 (COX-2) (Zhang e cols., 2007). Por RT-PCR observamos que a expressão do mRNA COX-2 após 3 e 24h de interação CME-*T. gondii* foi regulada positivamente. Estudos mostram que a região promotora do COX-2 revela vários elementos regulatórios potenciais, que podem afetar a transcrição do gene (Sivaramakrishnan e Devaraj, 2009). Em células  $\beta$ -pancreáticas vários fatores de transcrição regulam a expressão do gene COX-2, como por exemplo, o sinal transdutor e ativador da transcrição 1 (STAT1) que tem um papel negativo sobre o promotor COX-2 (Zhang e cols., 2007). Tem sido descrito que o *T. gondii* pode também manipular fatores de transcrição do hospedeiro, inclusive inibindo o STAT1 (Kim e cols., 2008). Então, nós sugerimos que a presença do *T. gondii* em CME pode estar induzindo o aumento na expressão de COX-2, mas se a inibição da STAT1 também ocorre permanece incerto, sendo então um campo de investigação em aberto.

Considerando que a COX-2 é uma prostaglandina-sintetase, nós também analisamos a síntese de PGE<sub>2</sub>. Nossos resultados mostram um importante aumento na síntese de PGE<sub>2</sub>, de 6h até 48h de infecção de CME com *T. gondii*. Entre outros fatores, nós pensamos que o sucesso da infecção de *T. gondii* no tecido muscular pode estar relacionado com o aumento na produção de COX-2 e conseqüentemente de eicosanóides PGE<sub>2</sub>. Em outros tipos celulares, estudos mostram que a conversão enzimática do ácido araquidônico em PGE<sub>2</sub> nos CL modula negativamente a resposta mediada por células, favorecendo não só patógenos intracelulares, mas também a sobrevivência do hospedeiro (Rangel Moreno e cols., 2002). Esses dados confirmam nossa hipótese de que o recrutamento de CL pelo *T. gondii* deve possivelmente estar relacionado com o desenvolvimento da fase crônica da doença em CME. Estudos com outros patógenos mostram aumento dos corpos lipídicos durante a infecção intracelular, por exemplo: *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium bovis* BCG induzem a formação de CL considerados domínios intracelulares para eicosanóides (Melo e cols., 2003; D'Avila e cols., 2006; Accioly e cols., 2008). Similarmente, nós descrevemos que o aumento da capacidade de células musculares em gerar PGE<sub>2</sub> no curso da infecção pelo *T. gondii* deve-se ao aumento da formação de CL. Assim, o recrutamento de organelas tais como, RE pelo parasito durante sua interação com a célula hospedeira, deve contribuir para os mecanismos que os patógenos intracelulares tem desenvolvido para sobreviver na célula hospedeira. Além disso, altas concentrações de PGE<sub>2</sub> potencialmente inibem a produção da resposta do tipo Th1, como a síntese do fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico (NO). Como

descrito, essas mudanças podem favorecer o crescimento intracelular do parasito, evitando danos maiores ao hospedeiro por contrabalancear com uma possível resposta celular (Renz e cols., 1988; Betz e Fox, 1991). Estudos adicionais são necessários para caracterizar a regulação e a função das prostaglandinas, na resposta inflamatória em CME, e se a presença de RS no VP está atuando como uma fonte de  $Ca^{2+}$  que justifique a preferência do tecido muscular no desenvolvimento da fase crônica da toxoplasmose.

A partir destes resultados, a modulação de outros indicadores inflamatórios, como as citocinas: interleucina-12 (IL-12) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), durante interação CME-*T. gondii* foi analisada. Relacionamos também a influência destas citocinas na reestruturação de componentes do citoesqueleto vistos em nossos ensaios iniciais no presente trabalho. Em nosso estudo, no decurso da miogênese os níveis de IL-12 e IFN- $\gamma$  não se alteraram. Porém, após 6, 24 e 48h de interação CME-*T. gondii* foi observado um aumento significativo da síntese destas citocinas. Apesar de não ser uma célula fagocítica profissional, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os trabalhos que mostram o músculo como um produtor de citocinas, as "miocinas". É descrito que macrófagos infectados pelo *T. gondii* sintetizam a IL-12, que promove a produção de IFN- $\gamma$  suprimindo a replicação parasitária (Silva e cols., 2009). No entanto, o controle da infecção aguda do *T. gondii* por IFN- $\gamma$ , induz diferenciação de taquizoítos para bradizoítos (encontrados em cistos teciduais) garantindo a sobrevivência do *T. gondii*, porém modulando negativamente a reativação da infecção. Desta forma, consideramos a IL-12 uma citocina essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra a replicação de patógenos intracelulares, como o *T. gondii* (Gazzinelli e cols. 1992; Denkers, 2003; Silva e cols., 2009). Um estudo demonstrou que a estimulação com IFN- $\gamma$  do endotélio vascular da retina de camundongos infectados pelo toxoplasma inibiu o crescimento do parasito dentro destas células (Brunton e cols., 2000). Ainda nesta mesma linha, Norose e cols. (2003) observaram uma maior carga parasitária na retina, coróide e nervo óptico dos camundongos com deficiência de IFN- $\gamma$ , sendo as formas taquizoítas predominantes em animais imunodeficientes e as formas bradizoítas, característica da fase crônica da doença, nos imunocompetentes.

Tem sido proposto que o *T. gondii* manipula algumas vias de sinalização da célula hospedeira principalmente através das proteínas das róprias, favorecendo a sua patogênese (Saeij e cols., 2007; Lalibert e Carruthers, 2008; Sibley e cols., 2009). Um exemplo é ROP16 que manipula as células do hospedeiro e fatores de

transcrição como STAT3 e STAT6 no início da infecção, podendo levar à inibição da produção do TNF, NO e IL-12 e induzindo a síntese de IL-10 (Gazzinelli e cols., 1992; Butcher e cols., 2005; Lalibert e Carruthers, 2008). Acreditamos que estas manobras atuem por diminuir a resposta celular descritas no início da infecção pelo *T. gondii* (como aumento da IL-12 e do IFN- $\gamma$ ), criando assim um ambiente favorável à replicação e sobrevivência do toxoplasma (Gazzinelli e cols., 1992; Butcher e cols., 2005; Saeij e cols., 2007; Laliberté e Carruthers, 2008; Sibley e cols., 2009).

Tem sido demonstrado que o IFN- $\gamma$  limita a replicação do parasito por estimular a óxido nítrico sintase. O NO tem sido diretamente relacionado com a supressão do crescimento do *T. gondii* e também na conversão das formas taquizoítos para bradizoítos em outros modelos celulares (Bohne e cols., 1994; Lüder e cols., 2003; Ibrahim e cols., 2009; Skariah e Mordue, 2010). Discutimos aqui que um fator determinante do efeito do IFN- $\gamma$  na replicação e conversão do *T. gondii*, pode estar relacionado não só com o tipo celular, mas também com a capacidade do IFN- $\gamma$  em induzir a síntese do NO nestas células (Skariah e Mordue, 2010). Recentemente, Ferreira-da-Silva e cols. (2009b) demonstraram que mesmo cepas virulentas do tipo RH durante o seu desenvolvimento em células musculares esqueléticas foram capazes de converter espontaneamente taquizoítos em bradizoítos. Esses estudos indicam que o IFN- $\gamma$  é indutor efetivo do estágio conversão em certos tipos celulares, mas também é requerido para limitar a replicação do parasito, prevenindo a lise da célula hospedeira e, permitindo o estabelecimento da fase crônica da infecção com a formação de cistos teciduais (Jones e cols., 1986; Soête e cols., 1994; Weiss e cols., 1995). Esses dados associados com a maior produção de IFN- $\gamma$  em CME durante a infecção pelo *T. gondii* com a cepa RH descrita na presente tese, pode explicar essa diferenciação espontânea. Além do IFN- $\gamma$ , o estágio de diferenciação tem sido amplamente descrito como uma resposta relacionada a um estresse provocado pelas condições hostis do ambiente, tais como estresses exógenos: pH alcalino ou ácido, química ou drogas, choque térmico e privação de nutrientes que aumentariam a eficiência do desenvolvimento de bradizoítos *in vitro*. Ferreira-da-Silva e cols. (2008, 2009a, b), contudo, demonstraram que essa diferenciação também ocorre espontaneamente *in vitro* em células musculares esqueléticas, ampliando questões sobre a importância das condições de estresse para disparar a estágio conversão sugerindo que o ambiente complexo celular, incluindo o tipo celular, melhor do que estresses exógenos possam governar e regular o desenvolvimento da diferenciação.



Observamos em algumas células da cultura após 48h de interação, que o *T. gondii* não completou seu ciclo lítico permanecendo na célula, apesar da grande quantidade de parasitos. É descrito que, com o aumento da área do vacúolo durante a fase de multiplicação, o *T. gondii* passa a recrutar microtúbulos e organelas para obtenção de nutrientes (Andrade e cols., 2001; Melo e cols., 2001; Coppens e cols., 2006; Lalibert e Carruthers, 2008). Nossos dados apontam também para a participação dos filamentos de actina neste processo. Apesar da visível desorganização dos filamentos de actina em miofibroblastos, mioblastos e miotubos já após 24h de interação, nossos ensaios bioquímicos mostraram um aumento significativo de  $\alpha$ -actina após 3 e 24h de interação. Este aumento pode ser explicado pela presença da actina ao redor do VP, principalmente de mioblastos e miofibroblastos. Desta forma, ensaios por RT-PCR se fazem necessários para confirmação da possível interferência do IFN- $\gamma$  e da IL-12 sobre a transcrição dos genes da  $\alpha$ -actina esquelética e  $\alpha$ -actina de músculo liso, específicas para mioblastos e miofibroblastos, respectivamente. Especulamos se o aumento da síntese do IFN- $\gamma$  e da IL-12 possa estar, mesmo que de forma indireta, envolvidos na síntese e remodelamento de  $\alpha$ -actina nas células do tecido muscular. Para células fagocíticas, sabe-se que o aumento de IL-12 por sua vez, pode promover a produção de IFN- $\gamma$  agindo através de STAT-4 (Denkers, 2003). Desta forma, acreditamos que o aumento da IL-12, observado na cultura de CME infectadas pelo *T. gondii*, possa estar diretamente relacionado com o aumento do IFN- $\gamma$ . Shi e Rockey (2010) demonstraram que o IFN- $\gamma$  pode regular vários genes, incluindo o fator de resposta do soro (SRF). O SRF é um fator de transcrição envolvido na síntese da  $\alpha$ -actina tanto em células musculares quanto em miofibroblastos e também nas alterações dinâmicas do citoesqueleto de actina, induzindo inclusive a formação de fibras de estresse (Miano e cols., 2007). Sugerimos então, que o IFN- $\gamma$ , via STAT1, possa estar inibindo a expressão SRF, afetando assim a síntese da  $\alpha$ -actina, como proposto por Shi e Rockey (2010). Nossos resultados mostram aumento da síntese da  $\alpha$ -actina em CME infectada pelo *T. gondii*. Uma possível explicação seria que durante a interação, o *T. gondii* possa interferir na via JAK/STAT inibindo a STAT1, através de uma proteína efetora do parasita ainda de forma desconhecida (Pollard e cols., 2009). É descrito que a inibição da STAT1 pelo *T. gondii* durante a interação possivelmente aumenta sua patogenicidade (Saeij e cols., 2007; Laliberté e Carruthers, 2008; Sibley e cols., 2009). Com esta inibição, o IFN- $\gamma$  não poderia mais influenciar na síntese do SRF, permitindo que os cofatores envolvidos, juntamente

com o SRF, fiquem livres para se ligarem ao promotor do gene para a síntese da  $\alpha$ -actina. Nossos resultados sugerem que após a síntese e polimerização da  $\alpha$ -actina o *T. gondii* pode: (i) levar à desorganização de seus filamentos para facilitar o processo de evasão da célula hospedeira (como descrito anteriormente), ou (ii) recrutar a actina, criando assim um ambiente favorável para desenvolvimento de cistos tecidual, como demonstrado na figura 6. Vale lembrar que este recrutamento foi também observado com relação aos microtúbulos, miosina, retículo sarcoplasmático juntamente com corpúsculos lipídicos.

Cheng e cols. (2008) mostraram que a expressão do IFN- $\gamma$  é regulada positivamente no músculo esquelético após lesão. Não é de interesse do parasito que a célula hospedeira sofra dano, assim o aumento da síntese de uma citocina que esteja envolvida no reparo e homeostase de suas células hospedeiras é uma estratégia que favorece o *T. gondii*. Nossas hipóteses são que: (i) algumas células da cultura possam estar funcionando transitoriamente como repositórios de parasitos, formando um pool de infecção para novas células nos sistemas, *in vitro* e *in vivo* e, (ii) o remodelamento da actina juntamente com a IL-12 e IFN- $\gamma$ , possam estar atuando no processo de modificação da MVP para o desenvolvimento precoce da cistogênese neste tecido.

Desta forma, sugerimos que as alterações na citoarquitetura da CME bem como na expressão da M-caderina ocorram em consequência do reposicionamento do RS, modulando os níveis de  $Ca^{+2}$  podendo ativar a calpaína-3. Além disso, o aumento dos CL acompanhado pela expressão da COX-2 e PGE<sub>2</sub> na célula hospedeira, pode estar contribuindo para o controle da síntese da IL-12 e do IFN- $\gamma$  frente infecção por *T. gondii*. Acreditamos que o Toxoplasma evoluiu de maneira a explorar moléculas e a própria resposta celular do hospedeiro, proporcionando assim um ambiente favorável para o estabelecimento da fase crônica da infecção na célula muscular esquelética.

## CONCLUSÕES

- A interação do *T. gondii* com cultura de células musculares esqueléticas mostrou diferenças na susceptibilidade à infecção entre mioblastos e miotubos sugerindo que a interação do parasita através da MIC2 seja dificultada pela baixa expressão de algumas proteínas de adesão em miotubos;
- A presença do *T. gondii* em CME modula negativamente a expressão de proteínas de adesão, como a M-caderina, inibindo assim a fusão de miócitos comprometendo a miogênese;
- A degradação da desmina altera a distribuição espacial do citoesqueleto ao longo da infecção de CME pelo *T. gondii* sugerindo uma facilitação para o egresso do parasito e/ou de um rearranjo de microfilamentos de actina, microtúbulos e miosina ao redor do vacúolo parasitóforo, estratégia para o estabelecimento da cistogênese;
- O acúmulo de actina em torno do vacúolo parasitóforo em mioblastos e miofibroblastos após 48h de interação, sugere que estas células seriam transitoriamente repositórias de parasitos, constituindo um pool para posterior infecção de novas células ou, que o recrutamento de actina pelo Toxoplasma em tempos tardios de infecção, poderia sinalizar o desenvolvimento da cistogênese;
- As diferenças morfológicas, observadas na análise histopatológica do tecido muscular de embriões com toxoplasmose congênita, revelaram alterações drásticas com relação ao desenvolvimento das fibras, de modo que a presença do parasito no início do desenvolvimento embrionário pode estar interferindo na miogênese da CME como observado nos ensaios *in vitro*;

- A infecção pelo *T. gondii* estimula a síntese de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira que são recrutados pelo *T. gondii* interagindo com o vacúolo parasitóforo sugerindo sua contribuição para o rápido crescimento da membrana do vacúolo, com aquisição de nutrientes pelo parasito durante a sua multiplicação;
- O aumento da síntese dos corpúsculos lipídicos foi acompanhado pelo aumento da produção das citocinas interleucina-12 e interferon- $\gamma$ , bem como da expressão da ciclooxigenase-2 e síntese da prostaglandina. Em conjunto, esses dados favorecem a hipótese de que estejam atuando na manutenção do toxoplasma em CME, favorecendo o desenvolvimento da fase crônica da toxoplasmose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT, Viola JP. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2008;15:1732-1740.
- Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.* 1990;144:2725-2729.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog* 2005;1:e17.
- Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today.* 1993;9:61-63.
- Andrade EF, Stumbo AC, Monteiro-Lea LH, Carvalho L, Barbosa HS. Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2001;33:337-341.
- Angermüller S, Fahimi HD. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem J.* 1982;14:823-835.
- Appleford PJ, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Trop.* 1997;65:97-104.
- Araújo-Jorge TC, Barbosa HS, Moreira AL, De Souza W, Meirelles MNL. The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblasts and fibers of skeletal muscle. *Z Parasitenkd.* 1986;72:577-584.
- Araya R, Riquelme MA, Brandan E, Saez JC. The formation of skeletal muscle myotubes requires functional membrane receptors activated by extracellular ATP. *Brain Res Rev.* 2004;47:174-188.
- Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *Int J Parasitol.* 2004;9:361-368. Review.
- Barbosa HS, Meirelles MNL. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct Funct.* 1995;20:275-284.
- Barbosa HS, Silva MFF, Guimaraes EV, Carvalho L, Rodrigues RM. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J Parasitol.* 2005;91:182-184.
- Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 2003;11:426-430. Review.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor

agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:463-478. Review.

Bebb JR, Leach L, Zaitoun A, Hand N, Letley DP, Thomas R, et al. Effects of *Helicobacter pylori* on the cadherin–catenin complex. *J Clin Pathol.* 2006;59:1261-1266.

Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem.* 1992;267:9281-9288.

Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16:585-595. Review.

Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 1991;146:108-113.

Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:167-196. Review.

Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:607-623. Review.

Blader IJ, Manger ID, Boothroyd JC. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem.* 2001;276:24223-24231.

Bohne W, Heesemann J, Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun.* 1993;6:1141-1145.

Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun.* 1994;62:1761-1767.

Bohne W, Roos DS. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;88:115-126.

Bonhomme A, Bouchot A, Pezzella N, Gomez J, Le Moal H, Pinon JM. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23:551-561. Review.

Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:79-88. Review.

Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med.* 1997;186:909-920.

Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 2007;113:30-49. Review.

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:540-551. Review.

Brossier F, Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:2266-2272. Review.

Brunton CL, Wallace GR, Graham E, Stanford MR. The effect of cytokines on the replication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*. 2000;102:182-188.

Buckingham M. How the community effect orchestrates muscle differentiation. *Bioessays*. 2003;25:13-16. Review.

Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:1-13.

Butcher BA, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ, Denkers EY. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol*. 2005;174:3148-3152.

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

Calore EE, Minkovski R, Khoury Z, Seguro AC, Perez Calore NM, Cavaliere MJ. Skeletal muscle pathology in 2 siblings infected with *Toxoplasma gondii*. *J Rheumatol*. 2000;27:1556-1559.

Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:339-348. Review.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 1997 ;73:114-123.

Carruthers VB, Sherman GD, Sibley LD. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem*. 2000;275:14346-14353.

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*. 2002;81:111-122. Review.

Carruthers VB, Blackman MJ. A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. *Mol Microbiol*. 2005;55:1617-1630. Review.

Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull*. 2007 May;33(3):745-51. Epub 2007 Feb 23. Review.

Carvalho TM, Ferreira AG, Coimbra ES, Rosestolato CT, De Souza W. Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1999;31:325-333.

- Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic*. 2008;9:657-64. Review.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-238. Review.
- Charlton CA, Mohler WA, Radice GL, Hynes RO, Blau HM. Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture. *J Cell Biol*. 1997;138 :331–336.
- Charrasse S, Comunale F, Grumbach Y, Poulat F, Blangy A, Gauthier-Rouvière C. RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell*. 2006;17:749-759.
- Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 2002;115:3049-3059.
- Charron AJ, Sibley LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic*. 2004;5:855-867.
- Chen X, Gumbiner BM. Crosstalk between different adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:572-578.
- Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, Koh TJ. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294:1183-1191.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:637-706. Review.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis *BMJ*. 2000;321:142-147.
- Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol*. 2000;149:167-180.
- Coppens I, Joiner KA. Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell*. 2003;14:3804-3820.
- Coppens I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 2006;8:1-9. Review.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, et al. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*. 2006;21:261-274.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1819-1830. Review.
- Costa RF, De Souza WM, Benchimol JF, Alderete JA, Morgado-Diaz. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Res*. 2005;15:704-716.



Crum-Cianflone NF. Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:473-494. Review.

Curci R, Battistelli M, Burattini S, D'Emilio A, Ferri P, Lattanzi D, et al. Surface and inner cell behaviour along skeletal muscle cell *in vitro* differentiation. *Micron.* 2008;39:843-851.

D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol.* 2006;176:3087-3097.

Darnell JE, Kerr IM Jr, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994;264:1415-1421. Review.

De Melo EJ, de Carvalho TU, de Souza W. Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* 1992;17:311-317.

De Melo EJT, De Souza WM. Pathway of C6-NBD-Ceramide on the host cell infected with *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct Funct.* 1996;21:47-52.

De Melo EJT, De Souza WM. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1997;83:252-256.

De Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:2069-2080. Review.

Dedieu S, Poussard S, Mazeret G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, et al. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res.* 2004;292:187-200.

Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. *J Anim Sci.* 2001;79:2097-2107.

Denkers EY. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;39:193-203. Review.

Derouin F. Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2:1368-1374. Review.

Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 1997;26:163-173.

Dodson MV, McFarland DC, Grant AL, Doumit ME, Velleman SG. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. 1996;13:107-126. Review.

Donalies M, Cramer M, Ringwald M, Starzinski-Powitz A. Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:8024-8028.

Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003;83:433-473. Review.

Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976;23:537-546.

Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol.* 1990;76:201-204.

Dubey JP. Toxoplasmosis an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991;22 Suppl:88-92. Review.

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;11:267-299. Review.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998a;28:1019-1024. Review.

Dubey JP. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology.* 1998b;116:43-50.

Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004;126:57-72. Review.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008;55:467-475. Review.

Dubey JP, Velmurugan GV, Ulrich V, Gill J, Carstensen M, Sundar N, Kwok OC, Thulliez P, Majumdar D, Su C. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from fetuses of different gestational ages. *Int J Parasitol.* 2008;38:1057-63.

Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan DW Jr, Pyne K, Harvey VS, Galli SJ, Lichtenstein LM. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol.* 1983;131:2965-2976.

Elliott DA, Clark DP. *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infect Immun.* 2000;68:2315-2322.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 2010;26:190-196. Review.

Eng H, Herrenknecht K, Semb H, Starzinski-Powitz A, Ringertz N, Gullberg D. Effects of divalent cations on M-cadherin expression and distribution during primary rat myogenesis *in vitro*. *Differentiation.* 1997;61:169-176.

Ferreira-da-Silva MF, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biosystems.* 2008;4:824-834. Review.

Ferreira-da-Silva MF, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho L, Gross U, Lüder C G, et al. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009a;140:196-200.

Ferreira-da-Silva MF, Takács AC, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. Int J Med Microbiol. 2009b;299:281-288.

Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science. 1997;276:718-725. Review.

Franzini-Armstrong C, Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. Physiol Rev. 1997;77:699-729. Review.

Frayn KN, Arner P, Yki-Jarvinen H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. Essays Biochem. 2006;42:89-103. Review.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: faecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 1970;167:893-896.

Frenkel JK. The stage-conversion time of *Toxoplasma gondii*: interpretation of chemical-biologic data out of parasitologic or host context. Parasitol Res. 1996;82: 656-658.

Furst DO, Osborn M, Weber K. Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. J Cell Biol. 1989;109:517-527.

Furtado GC, Cao Y, Joiner KA. Laminin on tachyzoites *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to b1 integrin receptor  $\alpha 6\beta 1$  on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. Infect Immun. 1992;60:4925-4931.

Gail M, Gross U, Bohne W. Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization. Mol Genet Genomics. 2001;265:905-912.

Gailit J, Marchese MJ, Kew RR, Gruber BL. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. J Invest Dermatol. 2001;117:1113-1119.

Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1992;149:175-180.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1994;153:2533-2543.

Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;219:127-39. Review.

Gherardi R, Baudrimont M, Lionnet F, Salord JM, Duvivier C, Michon C, et al. Skeletal muscle toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study. *Ann Neurol.* 1992;32:535-542.

Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 2002;12:46-54. Review.

Goebel HH, Fardeau M, Olivé M, Schröder R. 156th ENMC International Workshop: desmin and protein aggregate myopathies, 9-11 November 2007, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:583-592.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343:425-430. Review.

Goldszmid RS, Coppens I, Lev A, Caspar P, Mellman I, Sher A. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med.* 2009;206:399-410.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003;83:731-801. Review.

Gross U, Bohne W, Soète M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today.* 1996;12:30-3.

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.

Guimarães EV, Carvalho L, Barbosa HS. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;140: 170-174.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996;84:345-357. Review.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:622-634. Review.

Gupta N, Zahn MM, Coppens I, Joiner KA, Voelker DR. Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem.* 2005;280:16345-16353.

Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:656-662. Review.

Habib FS, Ali NM, El-Kadery AA, Soffar SA, Abdel-Razek MG. Sequential recognition of antigenic markers of *Toxoplasma gondii* tachyzoite by pooled sera of mice with experimental toxoplasmosis. *Parasitol Res.* 2011;108:151-160.

Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:502-514. Review.

- Hassene A, Vital A, Anghel A, Guez S, Series C. Acute acquired toxoplasmosis presenting as polymyositis and chorioretinitis in immunocompetent patient. *Joint Bone Spine*. 2008;75:603-605.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91:534-551. Review.
- Hawke TJ, Lessard S, Vickery L, Lipskie SL, Lindinger MI. Ouabain stimulates unidirectional and net potassium efflux in resting mammalian skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79:932-941.
- Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol*. 1996;156:1476-1481.
- Haynes BF, Heinly CS. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J Exp Med*. 1995;181:1445-1458.
- Heald R, Nogales E. Microtubule dynamics. *J Cell Sci*. 2002;115:3-4.
- Hijikata T, Murakami T, Ishikawa H, Yorifuji H. Plectin tethers desmin intermediate filaments onto subsarcolemmal dense plaques containing dystrophin and vinculin. *Histochem Cell Biol*. 2003;119:109-123.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:634-640. Review.
- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 2005;6:41-61. Review.
- Holland GN. Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host. *Int Ophthalmol*. 1989;13:399-402. Review.
- Hollnagel A, Grund C, Franke WW, Arnold HH. The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol*. 2002;22:4760-70.
- Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:575-584. Review.
- Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 2006;144:494-502.
- Ho-Yen DO, Joss AW, Chatterton JM. Congenital toxoplasmosis. *BMJ*. 1992;305:651-652.
- Hsiao SP, Chen SL. Myogenic regulatory factors regulate M-cadherin expression by targeting its proximal promoter elements. *Biochem J*. 2010;428:223-233.
- Hu K, Mann T, Striepen B, Beckers CJ, Roos DS, Murray JM. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell*. 2002;13:593-606.

Ibrahim HM, Bannai H, Xuan X, Nishikawa Y. *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18-mediated production of nitric oxide induces bradyzoite conversion in a CCR5-dependent manner. *Infect Immun*. 2009;77:3686–3695.

Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn*. 1994;199:326-337.

Jackson MH, Hutchison WM. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol*. 1989;28:55-105. Review.

Jan G, Delorme V, Saksouk N, Abrivard M, Gonzalez V, Cayla X, Hakimi MA, Tardieux I. A *Toxoplasma* type 2C serine-threonine phosphatase is involved in parasite growth in the mammalian host cell. *Microbes Infect*. 2009;11:935-945.

Jesse TL, LaChance R, Iademaro MF, Dean DC. Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol*. 1998;140:1265-1276.

Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*. 1990;249:641-646.

Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol*. 2002;157:557-563. Review.

Jones JL, Ogunmodede F, Scheftel J, Kirkland E, Lopez A, Schulkin J, Lynfield R. Toxoplasmosis-related knowledge and practices among pregnant women in the United States. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2003;11:139-145.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. *Exp Parasitol*. 2010;124:10-25. Review.

Jones TC, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med*. 1972;136:1173-1194.

Jones TC, Bienz KA, Erb P. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect Immun*. 1986;51:147-156.

Kalderon N, Gilula NB. Membrane events involved in myoblast fusion. *J Cell Biol*. 1979;81:411-425.

Kapitein LC, Hoogenraad CC. Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46:9-20.

Kaufmann U, Martin B, Link D, Witt K, Zeitler R, Reinhard S, et al. M-cadherin and its sisters in development of striated muscle. *Cell Tissue Res*. 1999;96:191-198. Review.

Kim SK, Fouts AE, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome wide transcriptional profiling. *J Immunol*. 2007;178:5154-5165.

Kim SH, Oh J, Choi JY, Jang JY, Kang MW, Lee CE. Identification of human thioredoxin as a novel IFN-gamma-induced factor: mechanism of induction and its role in cytokine production. *BMC Immunol.* 2008;9:64.

Knudsen KA, Myers L, McElwee SA. A role for the Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res.* 1990;188:175-184.

Kokta TA, Dodson MV, Gertler A, Hill RA. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domest Anim Endocrinol.* 2004;27:303-331. Review.

Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Spencer MJ. Regulation of the M-cadherin-beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.* 2006;26:8437-8447.

Laliberté J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:1900-1915. Review.

Lambert H, Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2010;12:292-300. Review.

Langermans JA, van der Hulst ME, Nibbering PH, van Furth R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect Immun.* 1992;60:5107-5112.

Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart JC, Castro G, Rouis M. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 24:504-510.

Lazarides E. Desmin and intermediate filaments in muscle cells. *Results Probl Cell Differ.* 1980;11:124-131.

Lefort CT, Wojciechowski K, Hocking DC. N-cadherin cell-cell adhesion complexes are regulated by fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem.* 2011;286:3149-60.

Levi G, Simonneau L, Saint-Jeannet JP, Thiery JP. Molecular transitions accompanying growth of the axial musculature of *Xenopus laevis*. *C R Acad Sci III.* 1993;316:822-837.

Lewis MR, Tracy RP. The role of the immune system in the insulin resistance syndrome. *Curr Diab.* 2002;2:96-99. Review.

Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE, et al. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1997;139:129-144.

Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res.* 2007;48:2751-61.

Littlefield R, Fowler VM. Defining actin filament length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:487-525. Review.

Liu X, Schnellmann RG. Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304:63-70.

Lopes FM, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Braz J Infect Dis.* 2007;11:496-506.

Luder CG, Algnier M, Lang C, Bleicher N, Gross U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int J Parasitol.* 2003;33:833–844.

Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:161-167. Review.

Luo Y, Radice GL. Cadherin-mediated adhesion is essential for myofibril continuity across the plasma membrane but not for assembly of the contractile apparatus. *J Cell Sci.* 2003 ;116:1471-1479.

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

Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Lorente SO, Gros L, Magaraci F, Gilbert IH, de Souza W, Vommaro RC. Evaluation of three novel azasterols against *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 2010; (in press).

Mège RM, Goudou D, Diaz C, Nicolet M, Garcia L, Geraud G, et al. N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localisation and effect of blockade by peptides and antibodies. *J Cell Sci.* 1992;103:897–906.

Mège RM, Gavard J, Lambert M. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:541-548. Review.

Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W. Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell.* 2001;25:53-59.

Melo RC, D'Ávila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 2003;35:59-67.

Melo RC, D'Ávila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;689:149-161.

Melo TG, Almeida DS, de Meirelles Mde N, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:531-540.

Melo TG, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* alters adherens junctions in cardiomyocytes. *Microbes Infect.* 2008;10:1405-1410.

Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1:a002899. Review.



Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma parasitophorous* vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell*. 2002;13:2397-2409.

Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol*. 2005;35:829-849. Review.

Mermall V, Post PL, Mooseker MS. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. 1998;279:527-533. Review.

Mermelstein CS, Andrade LR, Portilho DM, Costa ML. Desmin filaments are stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts. *Cell Tissue Res*. 2006;323:351-357.

Miano JM, Long X, Fujiwara K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C70-81. Review.

Michie KA, Löwe J. Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:467-492. Review.

Mishra R, Emancipator SN, Miller C, Kern T, Simonson MS. Adipose differentiation-related protein and regulators of lipid homeostasis identified by gene expression profiling in the murine db/db diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:913-921.

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

Moore R, Walsh FS. The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. *Development*. 1993;117:1409-1420.

Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*. 1999;190:1783-1792.

Morhun PJ, Weisz JM, Elias SJ, Holland GN. Recurrent ocular toxoplasmosis in patients treated with systemic corticosteroids. *Retina*. 1996;16:383-387.

Moura M de A, Amendoeira MR, Barbosa HS. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:862-864.

Moyen C, Goudenege S, Poussard S, Sassi AH, Brustis JJ, Cottin P. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:728-743.

Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harris AM, Jaffee EA. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1985;134:1982-1988.

Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. Nature. 1996;380:360-364.

Nichols BA, O'Connor GR. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. Lab Invest. 1981;44:324-335.

Nielsen S, Pedersen BK. Skeletal muscle as an immunogenic organ. Current Opinion in Pharmacology. 2008;8:346-351. Review.

Noden DM, Francis-West P. The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. Dev Dyn. 2006;235:1194-218. Review.

Nogueira N, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J Exp Med. 1976;143:1402-1420.

Norose K, Mun HS, Aosai F, Chen M, Piao LX, Kobayashi M, Iwakura Y, Yano A. IFN-gamma-regulated *Toxoplasma gondii* distribution and load in the murine eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:4375-4381.

Nunura J, Vásquez T, Endo S, Salazar D, Rodriguez A, Pereyra S, Solis H. Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52:107-110.

Opitz C, Di Cristina M, Reiss M, Ruppert T, Crisanti A, Soldati D. Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. EMBO J. 2002;21:1577-1585.

Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. J Cell Sci. 2005;118:2601-2611.

Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation *in vivo*: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. J Immunol. 2002;169:6498-6506.

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

Paulin D, Huet A, Khanamyrian L, Xue Z. Desminopathies in muscle disease. J Pathol. 2004;204:418-427. Review.

Pedersen BK, Febbraio MA. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. J Appl Physiol. 2007;102:814-816.

Pereira MC, Costa M, Chagas Filho C, de Meirelles MN. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1993;25: 559-569.

Pereira RO, de Carvalho TM, Barbosa HS, Porto LC, de Carvalho L. Enhancement of lipid bodies during differentiation of skeletal myofibroblasts of rat's fetus *in vitro*. *In vitro Cell Dev Biol Anim*. 2004;40:1-3.

Pizon V, Gerbal F, Diaz CC, Karsenti E. Microtubule-dependent transport and organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J*. 2005;24:3781-3792.

Pollard AM, Knoll LJ, Mordue DG. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. *Trends Parasitol*. 2009;25:491-494.

Portugal LR, Fernandes LR, Pietra Pedroso VS, Santiago HC, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JI. Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect*. 2008;10:276-284.

Pourquié O. Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Biol*. 2003;47:597-603. Review.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors invertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:747-783. Review.

Prandota J. The importance of *Toxoplasma gondii* infection in diseases presenting with headaches. Headaches and aseptic meningitis may be manifestations of the Jarisch-Herxheimer reaction. *Int J Neurosci*. 2009;119:2144-2182. Review.

Prats C, Donsmark M, Qvortrup K, Londos C, Sztalryd C, Holm C, Galbo H, Ploug T. Decrease in intramuscular lipid droplets and translocation of HSL in response to muscle contraction and epinephrine. *J Lipid Res*. 2006;47:2392-2399.

Pszenny V, Ledesma BE, Matrajt M, Duschak VG, Bontempi EJ, Dubremetz JF, Angel SO. Sub cellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;121:283-286.

Puzianowska-Kuznicka M, Kuznicki J. The ER and ageing II: calcium homeostasis. *Ageing Res Rev*. 2009;8:160-172. Review.

Radice G L, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen K A, Takeichi M, Hynes RO. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev. Biol*. 1997;181:64-78.

Rangel Moreno J, I. Estrada Garcia, M. De La Luz Garcia Hernandez, D. Aguilar Leon, R. Marquez, and R. Hernandez Pando. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2002;106:257-266.

Raynaud F, Astier C, Benyamin Y. Evidence for a direct but sequential binding of titin to tropomyosin and actin filaments. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1700:171-178.

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

Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. J Immunol. 1988;141:2388-2393.

Rose O, Rohwedel J, Reinhardt S, Bachmann M, Cramer M, Rotter M, Wobus A, Starzinski-Powitz A. Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture. Dev Dyn. 1994;201:245-259.

Rossi S, Stoppani E, Martinet W, Bonetto A, Costelli P, Giuliani R, Colombo F, Preti A, Marchesini S, Fanzani A. The cytosolic sialidase Neu2 is degraded by autophagy during myoblast atrophy. Biochim Biophys Acta. 2009;1790:817-828.

Saeij JP, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature. 2007;445:324-327.

Sakaguchi T, Kohler H, Gu X, McCormick BA, Reinecker HC. *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. Cell Microbiol. 2002;4:367-381.

Sanger JW, Chowrashi P, Shaner NC, Spalthoff S, Wang J, Freeman NL, Sanger JM. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. Clin Orthop Relat Res. 2002;403:153-162. Review.

Sanger JW, Kang S, Siebrands CC, Freeman N, Du A, Wang J, Stout AL, Sanger JM. How to build a myofibril. J Muscle Res Cell Motil. 2005;26:343-354.

Sanger JW, Wang J, Fan Y, White J, Sanger JM. Assembly and dynamics of myofibrils. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:858606. Review.

Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunvald E, Hieny S, Gazzinelli RT, Sher A. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. J Immunol. 1996;157:4045-4054.

Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. J Exp Med. 1997;185:1261-1273.

Schenkman S, Mortara RA. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J Cell Sci. 1992;101:895-905.

Schröder R, Schoser B. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. Brain Pathol. 2009;19:483-492. Review.

Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000; 218:115-124. Review.

Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology.* 2004;62:1363-1371. Erratum in: *Neurology.* 2004; 63:405.

Senegas A, Villard O, Neuville A, Marcellin L, Pfaff AW, Steinmetz T, MousliM, Klein JP, Candolfi E. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon-gamma-induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofetal interface. *Int J Parasitol.* 2009;39:481-487.

Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999;250:273-283. Review.

Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008;7:33-44.

Shah SB, Davis J, Weisleder N, Kostavassili I, McCulloch AD, Ralston E, Capetanaki Y, Lieber RL. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys J.* 2004;86:2993-3008.

Sheffield HG, Melton ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1968;54:209-226.

Shet A. Congenital and Perinatal Infections: Throwing New Light with an Old TORCH. *Indian J Pediatr.* 2011;78:88-95.

Shi Z, Rockey DC. Interferon-gamma-mediated inhibition of serum response factor-dependent smooth muscle-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2010;285:32415-32424.

Sibley LD, Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J Immunol.* 1991;147:2340-2345.

Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tub-vesicular network in host cells vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 1995;108:1669 -1677.

Sibley LD, Hakansson S, Carruthers VB. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol.* 1998;8:R12-14. Review.

Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic.* 2003;4:581-586. Review.

Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 2004;304:248-253. Review.

Sibley, LD., Qiu, W., Fentress, S., Taylor, S.J., Khan, A., Hui, R., Forward genetics in *Toxoplasma gondii* reveals a family of rhoptry kinases that mediates pathogenesis. *Eukaryot Cell.* 2009;8:1085-1093. Review.

Silva NM, Tafuri WL, Alvarez-Leite JI, Mineo JR, Gazzinelli RT. *Toxoplasma gondii*: in vivo expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF p55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions. *Microbes Infect.* 2002;4:261-270.

Silva NM, Vieira JC, Carneiro CM, Tafuri WL. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Exp Parasitol.* 2009;123:65-72.

Sinai AP, Joiner KA. Safe Haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:415-462. Review.

Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.* 1997;110:2117-2128.

Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 2001;154:95-108.

Sinai AP. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem.* 2008;47:155-164. Review.

Sivaramakrishnan V, Devaraj SN. Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model. *Chem Biol Interact.* 2010;183:284-292.

Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res.* 2010;107:253-260. Review.

Small JV, Sobieszek A. Studies on the function and composition of the 10-NM(100-A) filaments of vertebrate smooth muscle. *J Cell Sci.* 1977;23:243-268.

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

Soler, A.P., Gilliard, G., Xiong, Y., Knudsen, K.A., Martin, J.L., De Suarez, C. B., Mota Gamboa, J.D., Mosca, W., Zoppi, L.B., Overexpression of neural cell adhesion molecule in Chagas' myocarditis. *Hum Pathol.* 2001;32:149-155.

Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, Brigitte M, Poron F, Authier FJ, Chrétien F, Gherardi RK, Chazaud B. Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci.* 2006;119:2497-2507.

Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell.* 1999;98:159-169.

Spence HJ, Chen YJ, Winder SJ. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. *Bioessays.* 2002;24:542-552. Review.

Stahl W, Sekiguchi M, Kaneda Y. Multiple organ dysfunction in congenital murine toxoplasmosis. *Tokai J Exp Clin Med.* 2004;29:53-63.

Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:433-437.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988; 22;240:516-518.

Sweeney KR, Morrissette NS, LaChapelle S, Blader IJ. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii* is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton. *Eukaryot Cell.* 2010;9:1680-1689.

Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med.* 2009;266:372-389. Review.

Tassin AM, Paintrand M, Berger EG, Bornens M. The Golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *J Cell Biol.* 1985;101:630-638.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol.* 1998;194:114-128.

Tauchi-Sato K, Ozeki S., Houjou T., Taguchi R., Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition, *J Biol Chem.* 2002;277:44507-44512.

Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-1258. Review.

Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:364-369. Review.

Terres AM, Pajares JM, O'Toole D, Ahern S, Kelleher D. H. pylori infection is associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control. *J Clin Pathol.* 1998;51:410-412.

Tonino P, Finol HJ, Marquez A. Skeletal muscle pathology in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1996;28:521-526.

Tuckwell DS, Humphries MJ. Molecular and cellular biology of integrins. *CriRev Oncol Hematol.* 1993;15:149-171. Review.

Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem.* 2004;279:23699-23709.

Venticinque L, Jamieson KV, Meruelo D. Interactions between laminin receptor and the cytoskeleton during translation and cell motility. *PLoS One.* 2011;6:15895.-3642.

Walker ME, Hjort EE, Smith SS, Tripathi A, Hornick JE, Hinchcliffe EH, Archer W, Hager KM. *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. *Microbes Infect.* 2008;10:1440-1449.

Wang F, Sampogna RV, Ware BR. pH dependence of actin self-assembly. *Biophys J.* 1989;55:293-298.

Watkins SC, Cullen MJ, Hoffman EP, Billington L. Plasma membrane cytoskeleton of muscle: a fine structural analysis. *Microsc Res Tech*. 2000;48:131-141. Review.

Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Euk Microbiol*. 1995;42:150-157.

Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009;39:895-901. Review.

Weller PF, Ryeom SW, Picard ST, Ackerman SJ, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol*. 1991;113:137-146.

Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1994;18:853-862. Review.

Wu X, Jung G, Hammer JA. Functions of unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:42-51. Review.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Candidate genes responsible for common and different pathology of infected muscle tissues between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitol Int*. 2008;57:368-378.

Yap AS, Briehner WM, Pruschy M, Gumbiner BM. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol*. 1997;7:308-315.

Yap GS, Sher A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology*. 1999;201:240-247. Review.

Yu XW, Xu Y, Gong YH, Qian X, Yuan Y. Helicobacter pylori induces malignant transformation of gastric epithelial cells *in vitro*. *APMIS*. 2011;119:187-197.

Zehmer JK, Huang Y, Peng G, Pu J, Anderson RG, Liu P. A role for lipiddroplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*. 2009;9:914-921. Review.

Zhang L, Bertucci AM, Smith KA, Xu L, Datta SK. Hyperexpression of cyclooxygenase 2 in the lupus immune system and effect of cyclooxygenase 2 inhibitor diet therapy in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56:4132-4141.