

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

**Cistogênese e estágios esquizontes em células epiteliais de felinos  
infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, *in vitro***

por

***RENATA MORLEY DE MUNO***

Rio de Janeiro  
Agosto de 2011

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

**Cistogênese e estágios esquizontes em células epiteliais de felinos infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, *in vitro***

por

***RENATA MORLEY DE MUNO***

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

Orientadora: Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro  
Agosto de 2011

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

M967

Muno, Renata Morley de.

Cistogênese e estágios esquizontes em células epiteliais de felinos infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, *in vitro* / Renata Morley de Muno. – Rio de Janeiro, 2011.  
xii, 108 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.  
Bibliografia: f. 95-107

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Células epiteliais. 3. Interação *T. gondii*-célula epitelial. 4. Cistogênese. 5. Estágios esquizontes. I. Título.

CDD 616.9

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

Esta dissertação intitulada:

**Cistogênese e estágios esquizontes em células epiteliais de felinos infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, *in vitro***

Apresentada por:

***RENATA MORLEY DE MUNO***

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro – IOC/ Fiocruz - Presidente

Prof. Dra. Lais de Carvalho - Instituto de Biologia /UERJ

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO

Prof. Dr. Erick Vaz Guimarães - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - suplente e revisor

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta – Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF - suplente

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 e teve o apoio financeiro das seguintes entidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX- CNPq/FAPERJ

Projeto de Inovação Tecnológica - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Data da matrícula no Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: Agosto de 2009

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico esta dissertação  
aos meus pais que sempre se dedicaram à minha  
formação como ser humano e como profissional.  
Obrigada por estarem sempre ao meu lado.  
Eu amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois tenho certeza de que Ele abriu os caminhos para que eu chegasse à Fiocruz. É um privilégio imensurável fazer parte desta Instituição.

Dra. Helene, tenho muito orgulho de tê-la como minha orientadora. Tenho muito a lhe agradecer: por ter me dado a oportunidade de fazer a prova para o mestrado; por ter me incentivado durante e após a entrevista, assim como durante a minha trajetória até aqui; por ter confiado em mim; por ter me ajudado tanto nestes dois anos; por ter me ensinado tanto e, principalmente, estimulado constantemente meu crescimento profissional. Você é um exemplo para mim.

À minha família, principalmente meus pais, meu irmão, minha avó e minha madrinha, vocês são a minha base fortalecedora. Para vocês que eu corro com extrema alegria e entusiasmo para contar as minhas vitórias. Obrigada por todo apoio e principalmente amor! Eu amo muito todos vocês!

Ao Pietro, meu namorado, amigo e companheiro. Obrigada por todo esse amor. Seu apoio e incentivo alimentaram meus dias durante este último ano e hoje se tornaram fundamentais pra mim. Amo você!

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

Ao meu querido co-orientador Dr. Marcos Moura, obrigada pelas dicas, idéias, franqueza, amizade, constante estímulo e ensinamentos não só para a pesquisa, mas para minha vida toda.

Ao amigo e revisor, Dr. Erick, obrigada por estar sempre acessível e disposto a ajudar!

Às minhas companheiras de trabalho que felizmente se tornaram amigas e irmãs que estarão sempre comigo em meu coração: Sandra você foi e é muito importante pra mim e pra realização deste trabalho. Obrigada por realizar com tanto amor tudo que o que faz. Isto passa para todos os que trabalham contigo. Luciany, Juliana, Alessandra e Francine, amigas queridas demais, obrigada por me fazerem ter a clareza de que posso sempre contar com vocês. É recíproco!

Às alunas de iniciação científica e tecnológica, Andrea e Hanna, obrigada por estarem sempre dispostas a colaborar, isso é muito importante para nós.

Jessiquinha, você foi de extrema importância no início da minha trajetória, obrigada por ser tão dedicada como profissional e como amiga.

Marielle, obrigada por ter tanto carinho com meus blocos de eletrônica!

Pedro, obrigada por tanto incentivo durante as aquisições das imagens no Confocal.

Rubem, obrigada pelas dicas, por ser tão solícito, por ter me dado a oportunidade de aprender e trabalhar nos cursos de férias e por ser amigo nos momentos que precisei!

Priscilla e Esther, obrigada por todo suporte e carinho.

Agradeço muito ao Sr. Genésio, Sr. José e ao Rômulo, pelo profissionalismo, carinho e paciência! Vocês são muito queridos.

À equipe do LBE, sou muito grata por fazer parte desse laboratório.

Ao CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Ao IOC/ Fiocruz por toda estrutura profissional e acadêmica.

# 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. Toxoplasmose: epidemiologia e patogenia	02
3. Biologia do <i>Toxoplasma gondii</i>	04
3.1. Formas infectantes	04
3.2. Ciclo biológico	08
3.3. Ciclo enteroepitelial ou sexuado	09
3.4. Linhagens clonais de <i>T. gondii</i>	11
4. Diferenciação do <i>T. gondii</i>	12
5. Aspectos da interação <i>T. gondii</i> – célula hospedeira	14
6. Linhagens celulares	17
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
1. Manutenção de linhagens celulares epiteliais	21
2. Obtenção dos parasitos	22
2.1. Taquizoítos	22
2.2. Bradizoítos	22
3. Interação parasito-célula hospedeira	23
4. Ensaio de quantificação de infectividade	23
5. Monitoramento dos estágios morfológicos evolutivos do <i>T. gondii</i>	24

6. Análise ultraestrutural da interação parasito-célula hospedeira	25
6.1. Microscopia eletrônica de transmissão	25
6.2. Microscopia eletrônica de varredura	25
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
1. Análise da capacidade infectiva de <i>T. gondii</i> frente a duas linhagens de células epiteliais	27
1.1. Infectividade de taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH frente à IEC-6 e CRFK	27
1.2. Infectividade de bradizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa ME49 frente às células IEC-6 e CRFK	31
2. Caracterização morfológica ultraestrutural de CRFK	39
3. Caracterização da interação de bradizoítos de <i>T. gondii</i> -CRFK	44
3.1. Imunomarcação	44
3.2. Análise ultraestrutural durante a interação de <i>T. gondii</i> -células epiteliais	48
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>83</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>94</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>95</b>
<b>VIII. ANEXO</b>	<b>108</b>

## RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular, agente causador da toxoplasmose que é uma das zoonoses mais endêmicas do mundo. O *T. gondii* possui dois tipos de reprodução: assexuada, que origina dois estágios evolutivos infectivos, os bradizoítos e taquizoítos e a sexuada que ocorre no tecido epitelial intestinal, exclusivamente de felídeos, hospedeiros definitivos, resultando na formação de oocistos imaturos que são eliminados nas suas fezes. A disseminação de oocistos no ambiente é o principal fator que explica a distribuição mundial do parasito, associada à formação de cistos teciduais que aumentam a capacidade de transmissão do parasito, através do consumo de carne crua ou mal cozida. Dada a especificidade de o ciclo sexuado ocorrer no tecido epitelial, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar, *in vitro*, a interação do *T. gondii* com células epiteliais oriundas do intestino de ratos e de rim de felídeos, a fim de estabelecer possíveis correlações entre a origem do tecido (epitelial) e a fonte (rato e felídeos) que possam determinar o destino intracelular do parasito. Assim, culturas de linhagens celulares CRFK e IEC-6 foram infectadas com bradizoítos e taquizoítos de *T. gondii* com diferentes cargas infectivas. Após os desenhos experimentais as culturas foram processadas como de rotina para microscopia óptica de luz e fluorescência e para microscopia eletrônica de transmissão e varredura. As análises quantitativas mostraram que a linhagem CRFK foi mais susceptível à infecção frente aos dois estágios infectivos do que a linhagem IEC-6 e que essa diferença foi independente da carga parasitária e do estágio infectivo utilizados. As análises qualitativas mostraram que a linhagem CRFK foi mais susceptível à infecção do que a linhagem IEC-6 e esse evento foi independente da carga infectiva utilizada. As análises qualitativas mostraram que a cistogênese se estabeleceu de forma espontânea na CRFK quando infectada com bradizoítos da cepa ME49 ao se utilizar a carga infectiva de 1:10 (parasito-célula hospedeira). Além disso, esta linhagem celular apontou estágios infectivos morfológicamente distintos de taquizoítos e bradizoítos, similares aos estágios esquizontes de *T. gondii*. O presente estudo mostrou que existem diferenças no destino intracelular do parasito de acordo com o tipo celular utilizado. O emprego de células epiteliais de felinos como modelo celular da toxoplasmose experimental mostrou que pode contribuir com novos subsídios para o estudo da biologia celular do parasito, assim como contribuir como metodologia alternativa para o melhor entendimento do ciclo enteroepitelial do *T. gondii*. Este modelo celular abre um novo campo de investigação para aspectos moleculares desta interação que possam contribuir, por exemplo, para introdução de estratégias que venham a interferir em umas das principais vias de disseminação da toxoplasmose. Além disso, a CRFK se mostrou um modelo celular em potencial para a produção de cistos de *T. gondii in vitro* em larga escala abrindo perspectivas na redução do uso de animais experimentais para isolamento de cistos e inserção na área de inovação e desenvolvimento tecnológico.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; células epiteliais; interação *T. gondii*-célula epitelial; cistogênese; estágios esquizontes.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an intracellular protozoan parasite, the causative agent of toxoplasmosis which is one of the most endemic zoonoses in the world. *T. gondii* has two types of reproduction: the asexual, which leads two evolutive infective stages, the bradyzoites and tachyzoites and the sexual that occurs in the intestinal epithelial tissue, exclusively in cats, the definitive hosts, resulting in the formation of immature oocysts that are shed in their feces. The spread of oocysts in the environment is the main factor that explains the global distribution and dissemination of toxoplasmosis, leading to the formation of tissue cysts increasing the parasite capacity of transmission, through ingestion of raw or undercooked meat. Once the specificity of the sexual cycle occurs in epithelial tissue, the main objective of this study was to investigate the *in vitro* interaction of *T. gondii* epithelial cells derived from the intestine of rats and kidney of cats, in order to establish possible correlations between the origin of tissue (epithelial) and the source (rats and cats) that may determine the intracellular fate of the parasite. Thus CRFK and IEC-6 cell lines were infected with *T. gondii* bradyzoites and tachyzoites with different infective loads. The kinetic study of the infective capacity of both stages of the parasites was performed by fixing cell cultures at different times of interaction, aiming the quantitative analysis of infection of both cell types fronts of two strains and two infective stages of the parasite. After the experimental designs cultures were processed as routine for light microscopy and fluorescence and transmission and scanning electron microscopy. Quantitative analysis showed that CRFK line was more susceptible to infection than the IEC-6 line, and that this event was independent of the infective stage or the infective load used. The qualitative analysis showed that cystogenesis occurred spontaneously in the CRFK line when infected with the ME49 strain bradyzoites, by using the load of 1:10. In addition, this cell line pointed to morphologically distinct stages of tachyzoites and bradyzoites, similar to schizonts stages of *T. gondii*. The present study showed that there are differences in the intracellular fate of the parasite according to the cell type used. The use of feline epithelial cells as cellular model of experimental toxoplasmosis showed that it can contribute with new insights for studying the cell biology of the parasite as well as contribute as an alternative methodology for better understanding *T. gondii* enteroepithelial cycle. This cellular model opens a new field of investigation for molecular aspects of this interaction that can contribute, for example, to introduce strategies that will interfere in one of the main routes of toxoplasmosis spread. In addition, the CRFK line presented itself as a potential cellular model for cysts production *in vitro* in large scale opening perspectives on reduction in the use of animals for cysts isolation and insertion in innovation an technological development area.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; epithelial cells; *T. gondii*-epithelial cell interaction; cystogenesis; schizonts stages.

# *Introdução*

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Considerações gerais

*Toxoplasma gondii*, o agente etiológico da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório que infecta qualquer célula nucleada e acomete praticamente todas as espécies de mamíferos e aves. Este parasito foi identificado pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor norte-africano e, simultaneamente por Splendore no Brasil, em um coelho (Ferguson, 2009). O *T. gondii* é de distribuição cosmopolita e possui grande importância médica e veterinária devido à alta capacidade de causar abortos ou doenças congênitas nos seus hospedeiros intermediários (Tenter, 2000). Os gatos domésticos e outras espécies de felinos são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos no ciclo deste parasito e transmitem, através de suas fezes, os oocistos que são capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros intermediários, como aves e a maioria dos mamíferos de sangue quente, inclusive os seres humanos (Elmore et. al., 2010).

O ciclo de vida completo do *T. gondii* foi caracterizado em 1970, definindo o *Toxoplasma* como um parasito Coccidae que tem os felídeos como seus hospedeiros definitivos exclusivos e qualquer animal de sangue quente como hospedeiros intermediários (revisto em Ferguson, 2009). Nos hospedeiros intermediários e definitivos ocorre o processo de reprodução assexuada do parasito (Black e Boothroyd, 2000) que dá origem a dois estágios infectivos: os taquizoítos e os bradizoítos. Já a reprodução sexuada ocorre exclusivamente nas células intestinais superficiais de gatos domésticos e outros felídeos. No epitélio intestinal dos felídeos ocorre os processos de esquizogonia, gametogonia, e esporogonia resultando na formação de oocistos imaturos que são eliminados juntamente com as fezes destes animais no ambiente (Frenkel e Dubey, 1972; Dubey e Frenkel 1973; Dubey, 2002).

O conhecimento específico do ciclo entérico de *T. gondii* em felídeos é limitado e está restrito a seis artigos, que abordam a caracterização morfológica da diferenciação *in vivo* (Frenkel e Dubey, 1972; Dubey e Frenkel, 1972; Ferguson 1974; 2004; Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009). Dadas as

dificuldades de se utilizar gatos como modelo experimental, esses estudos tem evoluído muito pouco, sendo necessária a introdução de modelos alternativos, para que se possa avançar no conhecimento do ciclo do *Toxoplasma*. Existe uma carência de modelos celulares que possibilitem explorar *in vitro* o ciclo entérico do *T. gondii* que ocorre nos felídeos. Essa limitação se reflete diretamente na ausência de medidas de controle da Toxoplasmose em felídeos. Recentemente, nosso grupo desenvolveu um protocolo de obtenção e manutenção de enterócitos de felinos a partir de culturas primárias (Moura et al., 2009), apontando esse modelo como alternativa para o estudo da interação do *T. gondii*. Os estudos iniciais demonstraram formas evolutivas intracelulares dos parasitos muito semelhantes aos esquizontes do *T. gondii*, como descrito *in vivo*. Esse primeiro passo abre um leque de possibilidades para explorarmos o ciclo sexuado do *T. gondii*, *in vitro*.

Nas últimas décadas, a utilização de linhagens celulares representou um grande avanço global em vários aspectos: no custo dos experimentos, rapidez na obtenção dos resultados e ainda, evitando sacrifício de animais (Balls, 2007). Apesar dos vários estudos relacionados à produção de vacinas e cultivos virais em linhagens celulares de felinos (Lehmann et al., 1992a, b), poucas estão disponíveis para uso em pesquisa básica. Esse ponto é a motivação para o direcionamento dos objetivos que são propostos nesta dissertação empregando linhagens celulares epiteliais de felídeos e de ratos como modelos de estudo da interação e destino intracelular do *T. gondii*. Os aspectos ultraestruturais da interação taquizoítos e bradizoítos-célula hospedeira, assim como, aspectos comparativos entre essas interações frente a células epiteliais de diferentes origens poderão fornecer subsídios para o melhor entendimento da biologia do *T. gondii* em células epiteliais.

## **2. Toxoplasmose: epidemiologia e patogenicia**

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais endêmicas do mundo, com aproximadamente 25% da população mundial cronicamente infectada (Black e Boothroyd, 2000; Tenter et al., 2000). A disseminação da doença se deve aos diversos mecanismos de transmissão do parasito, principalmente pela: ingestão de bradizoítos contidos em cistos presentes em carne crua ou mal cozidas; ingestão

de esporozoítos contidos em oocistos presentes nas fezes de felídeos que contaminam alimentos, água e o solo do ambiente (Dubey et al., 2004); ingestão de leite contaminado com formas taquizoítas e pela transmissão congênita dessas formas na mulher durante a gestação (Tenter, 2009). A infecção de indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática, entretanto, o parasito gera sérias conseqüências aos portadores de doenças imunossupressoras como a AIDS e em fetos que estejam se desenvolvendo em gestantes recém infectadas (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Após a ingestão de bradizoítos ou esporozoítos, estes se diferenciam em taquizoítos, estágio em que o parasito se multiplica rapidamente se disseminando para diversas células e tecidos do hospedeiro, ocasionando a fase aguda da doença. Após a invasão das células hospedeiras, os taquizoítos são localizados no interior de um vacúolo parasitóforo (Sasono e Smith, 1998). Em indivíduos imunocompetentes, a produção de citocinas como IL-10, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-12 e óxido nítrico levam à morte de alguns parasitos e induzem uma mudança no ritmo de multiplicação destes, modulando a patogênese da doença (Gaddi e Yap, 2007). Desta forma, os parasitos, nos estágios taquizoítos, se diferenciam em bradizoítos, iniciando um processo de replicação lenta, acompanhada de uma reorganização na membrana do vacúolo parasitóforo, induzindo à formação da parede cística. Os cistos podem ser detectados entre seis a sete dias após a infecção (Dubey et al., 1998) e podem conter centenas de bradizoítos no seu interior. Essas formas podem persistir por longos períodos em diversos tecidos de seus hospedeiros. Entretanto, não são totalmente estáveis e parecem liberar esporadicamente bradizoítos que podem se converter a taquizoítos, invadir novas células adjacentes e interconverter a bradizoíto, formando novos cistos teciduais mesmo em hospedeiros imunocompetentes. Os cistos são encontrados principalmente nos tecidos muscular e nervoso, mas também há relatos de identificação de cistos em órgãos viscerais, como pulmões, fígado e rins (revisado por Skariah et al., 2010). Essas formas caracterizam a fase crônica da doença. Acredita-se que a parede cística forneça estabilidade e proteção aos parasitos contra a ação deletéria do sistema imune do hospedeiro, facilitando a persistência dos cistos por longos períodos no organismo (Weiss e Kim, 2000). Com a queda da resposta imune, como ocorre em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS),

ou em pacientes que receberam drogas imunossupressoras, ocorre a reativação da infecção. Esta reativação leva à liberação de bradizoítos e taquizoítos com rápida disseminação, resultando em demasiada destruição celular, provocando graves lesões em diversos órgãos, podendo ocasionar pneumonias e encefalite aguda, levando à morte do paciente. A infecção aguda numa gestante, principalmente no primeiro trimestre da gestação, pode provocar aborto e graves lesões neurológicas no feto (Gross, 2004).

Atualmente existem drogas que atuam efetivamente sobre as formas taquizoítas, porém esses medicamentos surtem pouco ou nenhum efeito em formas bradizoítas encontradas na fase crônica, além de possuírem efeitos colaterais (Tenter, 2009). Estes fatores conduzem à necessidade da introdução de novos medicamentos a partir da geração de conhecimento sobre a toxoplasmose, como por exemplo, com relação aos mecanismos moleculares da conversão taquizoíto-bradizoíto, nos diferentes modelos celulares envolvidos no ciclo de vida do *T. gondii*.

### **3. Biologia do *Toxoplasma gondii***

Protozoário intracelular obrigatório, o *T. gondii*, pertence ao filo Apicomplexa da classe Sporozoa. Uma das principais características que o classificou neste filo é a presença de um complexo apical onde se localizam organelas secretórias apicais, como róprias e micronemas. Este complexo atua decisivamente nos processos de reconhecimento celular, adesão e invasão do parasito às células hospedeiras (Dubey et al.,1998).

#### **3.1. Formas infectivas**

O *T. gondii* apresenta três formas infectivas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Esq.1).

Os taquizoítos possuem formato elíptico (4-8 µm de comprimento e 2-4 µm de largura) e se multiplicam por um tipo de reprodução assexuada chamada de endodiogenia, no interior de vacúolos parasitóforos (VP), formando rosetas e lisando a célula hospedeira para seu egresso, caracterizando assim, o ciclo lítico do parasito (Dubey et al.,1998). Os taquizoítos são encontrados no interior de

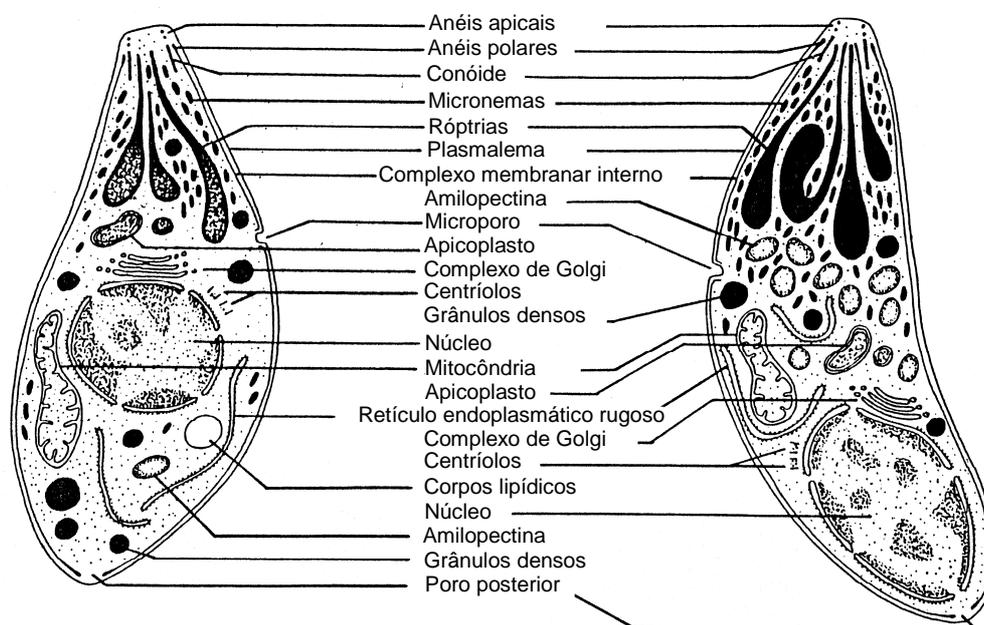
várias células nucleadas sempre envolvidos pela membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (Jones et al.,1972) e também no interior do núcleo da célula, onde a MVP não é observada (Barbosa et al., 2005). A forma taquizoíta é responsável pela fase aguda da infecção, causando forte inflamação, destruição tecidual e manifestações clínicas (Frenkel, 1974). Pela ultraestrutura celular, os taquizoítos apresentam um arranjo de microtúbulos subpeliculares, anéis apicais e polares, diversos grânulos densos e micronemas, grânulos de amilopectina raros ou ausentes, cinco a oito róptrias, apicoplasto, núcleo posicionado na região central do corpo do parasito, além das outras organelas típicas das células eucariotas (Dubey et al.,1998).

Os bradizoítos medem aproximadamente de 7-9  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2-4  $\mu\text{m}$  de largura (Mehlhorn e Frenkel, 1980) e são encontrados no interior de cistos teciduais, formas estas características da fase crônica da infecção. Reproduzem-se lentamente por endodiogenia no interior do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, modificam a membrana do vacúolo formando a parede cística dando origem ao cisto tecidual (Weiss e Kim, 2000). Apresentam o núcleo deslocado para região posterior do corpo do parasito, e ainda, róptrias bastante eletrondensas, grande número de micronemas e diversos grânulos de amilopectina ricos em polissacarídeos (Jacobs et al.,1960; Guimarães et al., 2003).

Cistos teciduais variam de tamanho, os jovens podem medir cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e os mais velhos podem conter centenas de organismos alcançando em média cerca de 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Dubey e Carpenter, 1993). O tamanho do cisto dependente de sua idade, do tipo da célula hospedeira e da cepa do *T. gondii* (Weiss e Kim, 2000). A parede dos cistos teciduais é rica em açúcares e outros polissacarídeos (Speer et al.,1998; Weiss e Kim, 2000; Guimarães et al., 2003), presentes nos órgãos viscerais, incluindo baço, fígado e rim, e principalmente nos tecidos nervoso e muscular. Os cistos podem permanecer intactos por toda a vida do hospedeiro, sem causar uma resposta inflamatória imunológica (Dubey e Welcome, 1988; Hill e Dubey, 2002).

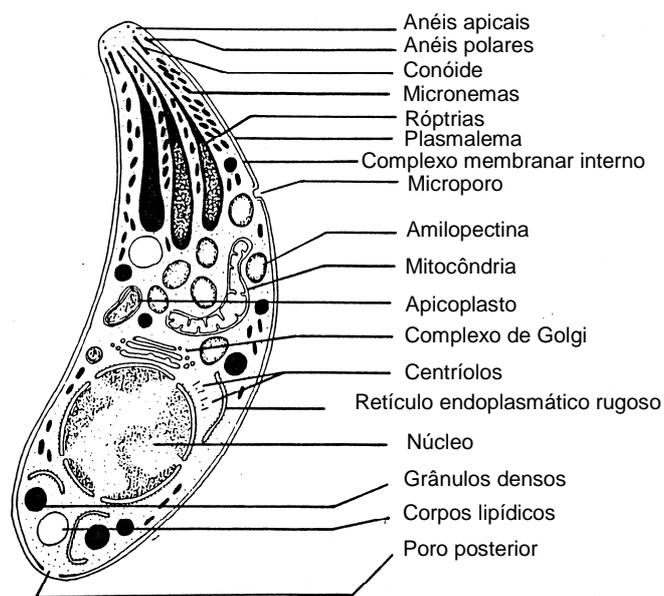
Os esporozoítos são formas infectivas encontradas no interior dos oocistos. Os oocistos são produzidos no epitélio intestinal dos felídeos e eliminados, ainda imaturos, junto com as fezes desses hospedeiros definitivos no meio ambiente, onde sofrem maturação e se tornam efetivamente infectivos para seus hospedeiros

(Dubey e Frenkel, 1973; Wong e Remington, 1993; Dubey et al.,1998). Morfologicamente os esporozoítos representam a forma intermediária entre taquizoítos e bradizoítos, considerando-se a quantidade de determinadas organelas (Speer et al.,1998). Eles apresentam um número intermediário de micronemas, um número superior de grânulos densos em relação aos taquizoítos e muitos grânulos de amilopectina como os bradizoítos (Dubey et al.,1998). Caracterizam-se pela presença muitos grânulos lipídicos que parecem ser uma exclusividade dos esporozoítos (Speer et al.,1998).



Taquizoite

Bradizoite



Esporozoite

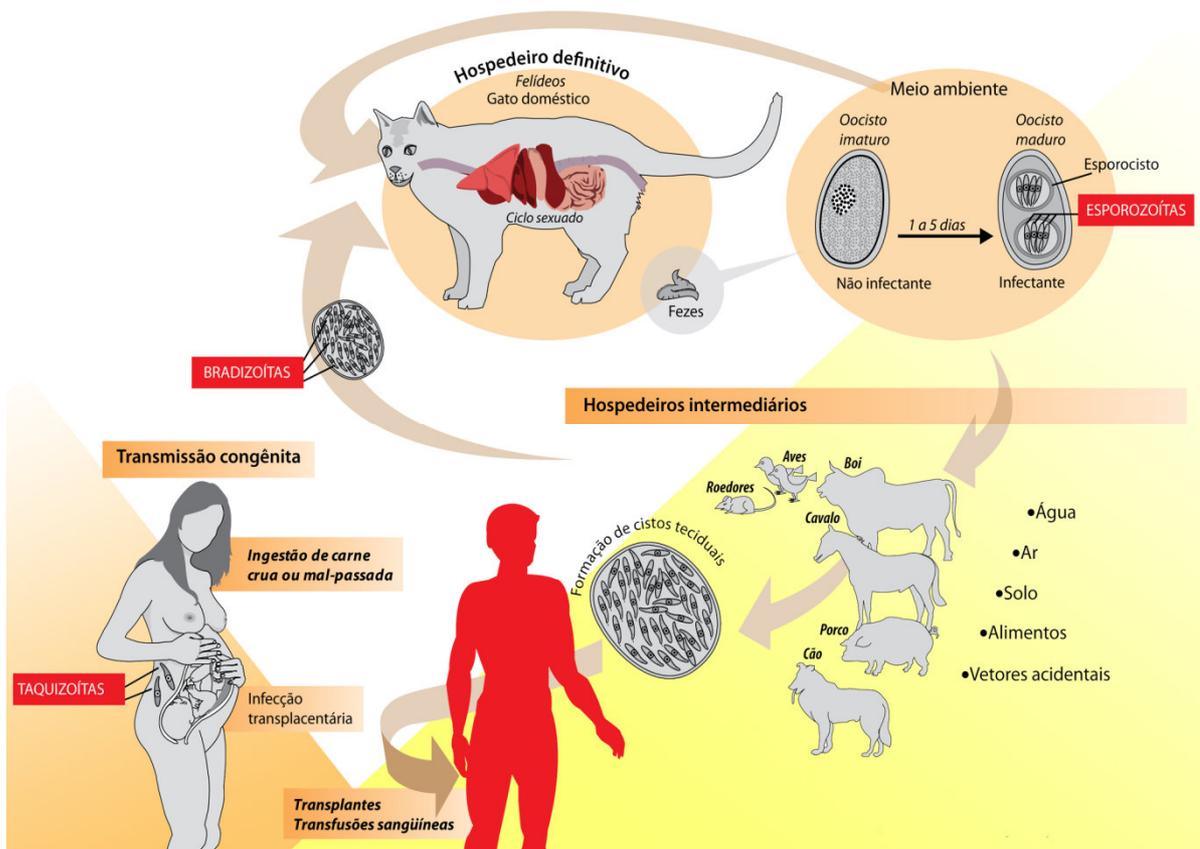
**Esquema 1: Ultraestrutura das formas infectivas de *T. gondii*.** Reproduzido e adaptado de Dubey et al. (1998).

### 3.2. Ciclo biológico

O *T. gondii* possui um ciclo de vida complexo, tendo apenas os felídeos como hospedeiros definitivos e outros mamíferos e aves como hospedeiros intermediários (Dubey e Welcome, 1988; Dubey et al., 2004).

O ciclo biológico do *T. gondii* (Esquema 2) pode se iniciar pela ingestão de cistos teciduais presentes principalmente nos músculos de hospedeiros intermediários que são presas comuns dos felídeos. Uma vez no trato digestivo do animal, a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas do estômago e intestino delgado dos felídeos e os parasitos na forma de bradizoítos são então liberados do cisto. Alguns parasitos atingem a lâmina própria do intestino, se diferenciam e multiplicam-se formando estágios taquizoítos e em poucas horas se disseminam para outros tecidos através do sangue ou da linfa. Alguns bradizoítos penetram nas células epiteliais intestinais superficiais dos felídeos (os enterócitos) onde ocorre formação de diferentes esquizontes por reprodução assexuada até a formação de gametas femininos e masculinos (revisto por Speer e Dubey, 2005 e Ferguson, 2009). Estes gametas, agora por reprodução sexuada formam o zigoto que após ser envolto por uma parede cística é chamado de oocisto. Quando os oocistos estão maduros são liberados para o ambiente externo junto com as fezes dos felídeos. No ambiente externo é que estes oocistos vão esporular e se tornar infectantes. Cada oocisto maduro, na sua forma infectiva contém 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada, que ingerido pelos animais, incluindo o homem, fecham o ciclo de vida deste parasito (Ferguson, 2009).

Os hospedeiros do *T. gondii*, incluindo os felídeos, adquirem este parasito através da ingestão de carnes cruas ou mal cozidas contendo cistos teciduais de outros animais infectados; de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, ou ainda, pela ingestão de leite contaminado com a forma taquizoíta do parasito que esteja infectando o animal produtor de leite (Tenter et al., 2000). Desta forma, podemos observar que o ciclo do *T. gondii*, além de complexo, é também dinâmico considerando-se que o parasito pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário ou vice-versa, bem como entre os hospedeiros definitivos e entre os hospedeiros intermediários (Tenter et al., 2000).



Moura et al. (2009)

**Esquema 2: Ciclo de vida do *T. gondii*:** Ciclo biológico ilustrado do *Toxoplasma gondii* mostrando as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos.

### 3.3. Ciclo enteroepitelial ou sexuado

Os gatos domésticos podem excretar milhões de oocistos após ingerir qualquer um dos três estágios infectantes do *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os oocistos são liberados por apenas um curto intervalo de tempo (1-2 semanas) na vida do gato (Dubey e Beattie, 1988; Dubey, 2002). O tempo de pré-patência (correspondente ao período da ingestão até a liberação dos oocistos no ambiente) e a frequência da liberação destes oocistos, dependem da forma infectante ingerida (revisado em Dubey, 1998; Dubey, 2002; 2006). Dessa forma, a

liberação de oocistos pode ocorrer de três a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais (Dubey, 2001; 2006), 19 dias ou mais após a ingestão de taquizoítos (Dubey, 2002) e de 18 ou mais dias após ingerir oocistos. A eficácia da transmissão do *T. gondii* é maior quando felinos ingerem cistos teciduais (por carnivorismo) e quando camundongos, representando os hospedeiros definitivos, ingerem oocistos (Dubey, 2006), demonstrando assim a importância do papel dos felídeos no ciclo do *T. gondii*.

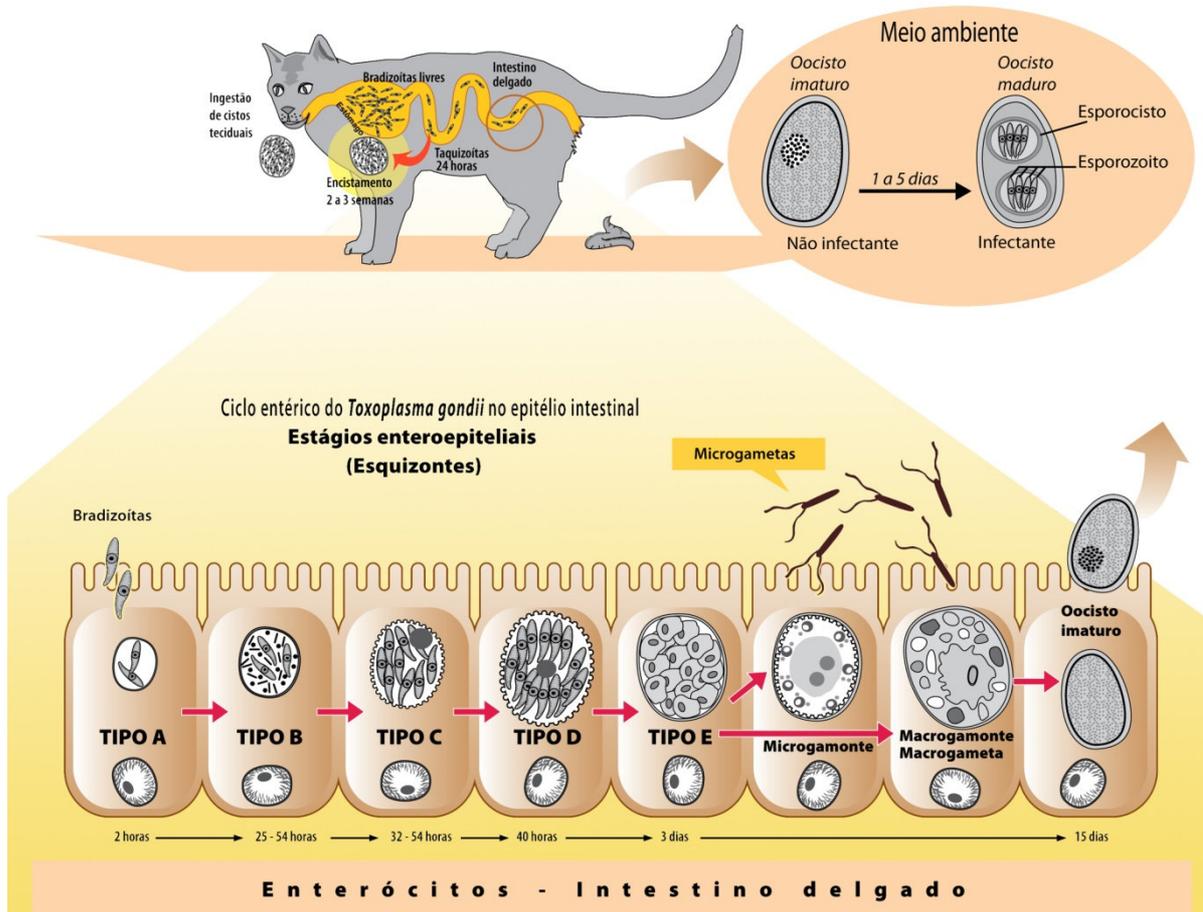
Após a ingestão dos cistos teciduais pelos gatos, sua parede é destruída por enzimas proteolíticas do estômago, liberando os bradizoítos, que irão infectar o epitélio intestinal. Os bradizoítos liberados penetram na parede intestinal iniciando o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii* (Esq. 3) (Dubey e Frenkel, 1972). Inicialmente, ocorre o desenvolvimento de cinco tipos morfológicamente distintos de *T. gondii*, ou esquizontes, ou estágios enteroepiteliais (tipos: A, B, C, D e E). Os esquizontes se multiplicam exclusivamente nas células superficiais do intestino delgado (enterócitos) dos felinos e dão origem aos merozoítos (Dubey e Frenkel, 1972; Frenkel e Dubey, 1972), antes do início da gametogênese (revisado por Speer e Dubey, 2005).

A gametogênese do *T. gondii* ocorre nas células superficiais do intestino delgado, mais comumente na região jejuno-ileal. Os gametas masculinos flagelados ou microgametas deixam as células da parede intestinal, caem na luz intestinal e são atraídos pelos gametas femininos ou macrogametas (revisado por Speer e Dubey, 2005; Ferguson, 2009). A fecundação ocorre nas células da parede intestinal, dando origem ao ovo ou zigoto com a formação da parede do oocisto. As células epiteliais infectadas se rompem liberando os oocistos imaturos no lúmen do intestino (Dubey e Frenkel, 1972), que são liberados junto com as fezes do felino e então, esporulam no ambiente. Os oocistos não esporulados têm a forma sub-esférica e dupla membrana. Cada oocisto maduro possui dois esporocistos e em cada esporocisto existem quatro esporozoítos (revisado em Dubey et al., 1998).

Paralelamente, o ciclo assexuado ocorre também nos felinos gerando lesões semelhantes àquelas observadas no quadro clínico dos hospedeiros intermediários (Dubey e Frenkel, 1972).

Hipóteses apontam que o ciclo sexuado desse parasito deva ser orquestrado e modulado por moléculas presentes nos enterócitos de felídeos que induzem as

fases citadas acima, já que elas ocorrem exclusivamente nesse hospedeiro (Moura et al., 2009).



**Esquema 3: Ciclo enteroepitelial do *T. gondii*:** Estágios enteroepiteliais do ciclo do *Toxoplasma gondii* nos células epiteliais superficiais do intestino delgado do gato doméstico. Criação e adaptação por M. Moura e H. Barbosa (2009) com base principalmente nos artigos de Ferguson (2004) e Speer e Dubey (2005).

### 3.4. Linhagens clonais de *T. gondii*

A maioria dos isolados identificados na Europa e na América do Norte pertence a um dos três genótipos: tipo I, tipo II e tipo III. A diferença genética entre essas linhagens clonais é de uma taxa de aproximadamente 1% entre seus genes. Análises genéticas detalhadas evidenciam que a variação gênica dentro de cada

genótipo de *T. gondii* é rara (Boothroyd e Grigg, 2002; revisto em Montoya e Liesenfeld, 2004).

Diferenças quanto à virulência e epidemiologia são encontradas entre essas três linhagens clonais. Linhagens do tipo I, como a RH, são altamente virulentas. Em geral, formam menos cistos em cultura e em animais, e têm sido freqüentemente associadas com a toxoplasmose ocular em pacientes imunocomprometidos (Boothroyd e Grigg, 2002; Kim e Weiss, 2004). As linhagens do tipo II, como a ME49, são menos virulentas podendo causar mortalidade dependendo da carga parasitária e/ou susceptibilidade do indivíduo. Em geral são cepas cistogênicas e em muitos estudos nos Estados Unidos e Europa, são as mais prevalentes causas da toxoplasmose humana, mais especificamente com relação à infecção congênita e em pacientes com AIDS. Cepas isoladas de animais são na sua maioria do genótipo III, que são cepas moderadamente virulentas (Howe e Sibley, 1995; revisto em Weiss e Kim, 2000; Ajzenberg et al., 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Existe um grande interesse em se avaliar como um genótipo de *T. gondii* pode diferir na sua capacidade infectiva ou na patogênese da doença em uma determinada espécie animal. O entendimento dos fatores genéticos que influenciam a virulência e o mecanismo de seleção genotípica de acordo com a espécie hospedeira pode agregar conhecimentos que contribuam para o desenvolvimento de terapias que interfiram na transmissão da doença (revisto em Saeij et al., 2005).

#### **4. Diferenciação do *T. gondii***

Os mecanismos moleculares que regulam a conversão de estágio de taquizoítos ↔ bradzoítos ainda não estão bem esclarecidos. Alguns estudos da interconversão taquizoítos ↔ bradizoítos propõem que o tipo celular não influencie na interconversão e formação de cistos teciduais (Lindsay, 1991). Esta proposta é sustentada por resultados mostrados em vários estudos onde a interconversão pode ser induzida *in vitro* por mudanças na temperatura ou no pH do meio (Soête et al., 1994), por citocinas pró-inflamatórias ou inibidores de mitocôndria (Bohne et

al.,1994), ou deleção de nutrientes do meio (Fox et al., 2004). Recentemente, nosso grupo empregando células musculares esqueléticas sugere fortemente que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes para a formação de cistos. Nestas culturas, em que células musculares foram infectadas com taquizoítos de cepa virulenta tipo I (RH), verificou-se a conversão de taquizoíto para bradizoíto na ausência de estímulos exógenos de estresse (Ferreira-da-Silva et al., 2009). Além disso, linhagens de células musculares mostram ser mais eficientes na capacidade de conversão de taquizoítos para bradizoítos quando comparadas às culturas de fibroblastos, reforçando a idéia de que o fenômeno de conversão do *T. gondii* está certamente associado a outros fatores, como por exemplo, dependente do nicho celular onde a infecção se estabeleça (Ferreira-da-Silva et al., 2008, 2009 a,b).

Embora o desenvolvimento de cistos teciduais, *in vitro*, com cepas avirulentas (tipos II e III) de *T. gondii* já tenha sido descrito há mais de 40 anos (Lainson, 1958), o interesse em estudar a interconversão deste parasito ficou em segundo plano até o momento da descoberta de antígenos estágio-específico e conseqüente produção de anticorpos contra esses antígenos (revisto em Weiss e Kim, 2000).

Vários marcadores têm sido avaliados e vários sistemas têm sido desenvolvidos para estudar a diferenciação, *in vitro*. O desenvolvimento de anticorpos estágios-específicos tem possibilitado estudar os mecanismos de conversão do *T. gondii* (Jones et al.,1986; Lindsay et al.,1991; Soête et al.,1993, 1994; Weiss et al.,1994; 1995; Bohne et al.,1995; Gross et al.,1996; Halonen et al.,1996; Lane et al.,1996; Sahm et al.,1997; Guimarães et al., 2008; Ferreira-da-Silva et al., 2008b; 2009).

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

Os mecanismos moleculares que regulam a diferenciação do *T. gondii* em estágios enteroepiteliais também ainda não estão bem esclarecidos. O desenvolvimento de um modelo celular para o estudo do ciclo sexuado do *T. gondii*, ainda é um grande desafio para compreensão dos seus estágios enteroepiteliais.

Apenas a indução do ciclo sexuado por bradizoítos *in vivo* foi bem estudada. Felinos que ingeriram cistos teciduais desenvolveram os estágios enteroepiteliais e formaram oocistos (Dubey e Frenkel, 1972; Hill e Dubey, 2002). Os estudos desenvolvidos por Dubey e Frenkel (1998) indicam que o ciclo sexuado é mais curto e a quantidade de liberação de oocistos é maior quando os felinos ingerem cistos teciduais ou bradizoítos. Estudos prévios mais recentes demonstraram o desenvolvimento de formas estruturais com características semelhantes às formas esquizontes de *T. gondii* em culturas de enterócitos de felinos *in vitro*, à semelhança do que tem sido descrito previamente, *in vivo* (Moura et al., 2009). Essa lacuna na biologia do parasito reflete diretamente na ausência de medidas de controle da toxoplasmose em felídeos.

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

O *T. gondii* e todos os membros do filo Apicomplexa são parasitos intracelulares obrigatórios que têm a necessidade de invadir as células hospedeiras e migrar através dos tecidos. Como não possuem pseudópodes, cílios ou flagelos, os parasitos deste Filo usam um modo de motilidade dependente do substrato para invadir a célula, chamado de motilidade por deslizamento ("gliding motility") (Sibley e cols., 1998). Estudos com *T. gondii* têm revelado que a invasão da célula hospedeira é um processo bastante complexo que ocorre por meio da liberação seqüencial de proteínas presentes nos micronemas, róptrias e grânulos densos do parasito (Opitz e Soldati, 2002; Sibley, 2003). Esses eventos moleculares compreendem: ligação receptor-ligante, transdução de sinais, mobilização do sistema actina-miosina, regulação da exocitose das organelas secretoras e modificação proteolítica das proteínas de superfície do parasito (Howell e cols., 2005). 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). 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, a laminina 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 a). O reconhecimento de múltiplos glicosaminoglicanos sulfatados na superfície da célula hospedeira também contribui para a adesão e invasão deste parasito em diferentes tecidos (Chatterton e cols., 2002). Em taquizoítos, SAG1 (p30), principal proteína de superfície de taquizoítos com 30KDa, é reconhecida por moléculas glicosilados da célula hospedeira (Bonhomme e cols., 1999). As proteínas adesivas são altamente conservadas, como as proteínas do micronema (MIC) em *T. gondii* (Wan e cols., 1997). Diversas proteínas dos micronemas formam complexos adesivos com domínios (integrinas, fator de crescimento epidermal - EGF, trombospondinas e lectinas) semelhantes aos encontrados em proteínas de vertebrados que reconhecem receptores na superfície das diversas células hospedeiras, como heparan sulfato, proteoglicanas e laminina (Chatterton e cols., 2002). A existência destes diferentes complexos sugere que interações moleculares estariam envolvidas na movimentação do parasito através das barreiras biológicas, enquanto outros estariam envolvidos na penetração na célula hospedeira, capacitando o parasito para o reconhecimento de uma variedade maior de receptores, amplificando assim sua gama de hospedeiros (Chatterton e cols., 2002).

Algumas proteínas da superfície de *T. gondii* envolvidas na invasão do parasito, apresentam propriedades proteolíticas, demonstradas pela sensibilidade do parasito aos inibidores de proteases durante a invasão (Carruthers, 2002). Esse processo envolve as proteínas adesivas TgMIC2 e TgMIC6 secretadas pelos micronemas, sendo então translocadas até a superfície do taquizoíto e posteriormente liberadas, após a clivagem proteolítica dos seus domínios transmembranas (DTM) (Opitz e Soldati, 2002; Harper e cols., 2006). A clivagem da protease-1 do micronema (MPP1), protease transmembranar, é necessária para o processo de invasão do *T. gondii* na célula hospedeira (Brossier e Sibley, 2005; Brossier e cols., 2005). A secreção coordenada dos micronemas e das róprias identifica 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 invasão, localizando-se em uma constrição denominada junção móvel (JM), na qual as membranas do parasito e do hospedeiro ficam em íntimo contato (Alexander e cols., 2005). Aparentemente, a JM serve para excluir algumas proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira, dando início à formação e modificação da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (Mordue e cols., 1999). Outras proteínas das róprias são inseridas na MVP, contribuindo para sua formação durante a invasão da célula hospedeira pelo *Toxoplasma* (Boothroyd e Dubremetz, 2008).

Moléculas tanto da célula hospedeira quanto do parasito participam da formação e desenvolvimento do vacúolo parasitóforo (VP). Depois da invasão a MVP é bioquimicamente modificada por uma intensa exocitose de moléculas das róprias e grânulos densos (Carruthers, 2002). Durante o processo de multiplicação do parasito, ocorre um aumento significativo da extensão da MVP. Alguns autores atribuem este aumento à incorporação de moléculas provenientes de organelas do hospedeiro como o retículo endoplasmático e mitocôndria (de Melo e de Souza, 1997; Sinai e cols., 1997).

As proteínas dos grânulos densos participam da modificação do VP e são secretadas logo após a interiorização dos parasitos (Brossier e Sibley, 2005). 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 rede membranosa nanotubular (RMNT) (Mercier e cols., 2002). A GRA7 encontrada na MVP tem sido recentemente relacionada com a formação dos microtúbulos derivados da invaginação da MVP, que estariam atuando no transporte de lipídeos, através do espaço vacuolar até o parasito (Coppens e cols., 2006).

Assim, a formação e desenvolvimento do vacúolo parasitóforo (VP) envolve moléculas de ambas as células (parasita 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 e 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).

## 6. Linhagens celulares

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

Recentemente, alguns trabalhos relataram o estabelecimento e a caracterização de cultivos primários intestinais de animais domésticos: intestino de bovinos (Follmann et al., 2000; Birkner et al., 2004; Rusu et al., 2005; Kaushik et al., 2008); intestino delgado de caninos (Weng et al., 2005; Golaz et al., 2007) e intestino de suínos (Badylak et al., 1998; Lindberg e Badylak, 2001).

O estabelecimento de linhagens celulares intestinais de mamíferos é um processo muito difícil, devido à complexidade celular do intestino, da dependência do contato entre as células e a necessidade de fatores de crescimento (Strater et al., 1996).

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

período de cultivo (na maioria dos casos 7 a 14 dias), sendo inadequadas, por exemplo, para estudos de transformação celular (Bartsch et al., 2004).

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

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

Apesar de vários estudos relacionados à produção de vacinas e cultivos virais em linhagens celulares de felinos (Lehmann et al.,1992a; Lehmann et al.,1992b), poucas estão disponíveis para uso em pesquisas. Podemos destacar as linhagens de: macrófagos FCWS-4 (Jacobse-Geels e Horzinek, 1983); linfoblastos: NCE-F161 (Allison e Gregoriadis, 1990), FeLV-3281 (Donahue et al.,1988), Fc3Tg (Nelson-Rees et al.,1972), MYA-1 (Miyazawa et al.,1992) e FL74-UCD-1 (Pedersen et al.,1979); linfócitos T: FeT-J e FeT-1c (Yamamoto et al.,1998); células da glia: PG-4 (S+L-) e astrócitos G355-5 (Haapala et al.,1985).

Na ausência de linhagens intestinais de felinos disponíveis em bancos de células, linhagens epiteliais são os modelos mais próximos para estudos comparativos morfofisiopatológicos intestinais, e para isso temos disponível duas linhagens: epitélio hepático AK-D (Cantin e Woods, 1993) e epitélio renal CRFK (Crandell et al.,1973).

Os aspectos ultraestruturais da interação taquizoítos e bradizoítos-célula hospedeira, assim como aspectos comparativos entre essas interações frente a células epiteliais de diferentes origens poderão fornecer subsídios para o melhor entendimento do ciclo sexual do parasito. A revelação do comportamento dessas duas formas infectivas frente às células de origens distintas pode esclarecer se o tipo celular tem um papel decisivo neste processo.

O emprego de células de felinos, mesmo linhagem celular CRFK (células do epitélio renal de felinos), para o estudo da interação *T. gondii* com formas bradizoítas e taquizoítas é pioneiro e vem sendo utilizado por nosso grupo. Estudos preliminares têm demonstrado a capacidade de formação de cistos nestas células. Essa abordagem abre novas perspectivas no estudo da biologia celular do parasito, com destaque para as abordagens do ciclo celular que ocorre nos hospedeiros definitivos, os felinos.

O emprego de células epiteliais intestinais, mesmo linhagem originadas de ratos, como a IEC-6, se justifica por serem as células epiteliais do intestino o microambiente onde ocorre o ciclo sexuado do parasito, servindo como um modelo comparativo entre a linhagem de felinos CRFK (células epiteliais de rim de felinos) e a cultura primária de enterócitos de felinos.

Os mecanismos que regem a diferenciação do *T. gondii* em células epiteliais e as lacunas no conhecimento do ciclo sexuado são a motivação para o desenvolvimento dos objetivos propostos a seguir nesta dissertação. Nossa proposta é que estes modelos celulares possam fornecer subsídios ao desenvolvimento de estratégias que efetivamente causem uma interferência na disseminação dos parasitos na natureza, assim como fornecer dados *in vitro*, que possam agregar conhecimento ao ciclo entérico do *T. gondii* descrito, *in vivo*.

# *Objetivos*

## II. OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Avaliar o ciclo intracelular do *Toxoplasma gondii* em células epiteliais de ratos e de felinos.

### **1. Objetivos específicos:**

- 1.1. Avaliar comparativamente os índices de infecção de duas linhagens epiteliais (CRFK e IEC-6) frente à infecção por bradizoítos (cepa ME49) e taquizoítos (cepa RH) de *Toxoplasma gondii* com diferentes cargas infectivas.
- 1.2. Monitorar o destino intracelular de taquizoítos (cepa RH) e bradizoítos (cepa ME49) de *T. gondii* em duas linhagens epiteliais (CRFK e IEC-6) com diferentes cargas infectivas.

*Materiais e  
Métodos*

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais, da Fundação Oswaldo Cruz, Resolução 242/99 através da licença CEUA LW 10-10 e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos.

#### 1. Manutenção de linhagens celulares epiteliais

Considerando-se que o ciclo enteroepitelial do *T. gondii* ocorre exclusivamente no epitélio intestinal de felídeos, seus hospedeiros definitivos, foram utilizadas duas linhagens epiteliais: IEC-6 do epitélio normal do intestino delgado de *Rattus norvegicus* (rato) (BCRJ Nº AP003) e CRFK de epitélio normal do córtex renal de *Felis catus* (gato doméstico) (BCRJ Nº CR0268), ambas adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br>).

O desenho experimental objetivou avaliar se o tipo celular ou a origem das células era capaz de modular a infecção. Para isso, as linhagens CRFK e IEC-6 foram semeadas na concentração de  $1,0 \times 10^5$ /ml em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> (Gibco BRL, UK), em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/Hams F12 - Sigma-Aldrich), suplementado com 1% solução de antibiótico (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (SFB – CultLab). As células foram mantidas em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> a temperatura de 37°C. A cada dois dias, metade do meio era descartada e o mesmo volume de meio fresco era adicionado. As células foram cultivadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Neste ponto, as células foram tratadas com solução de dissociação (salina tamponada com fosfato - PBS, suplementado com 25% de ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA e 25% de tripsina) durante 10 min a 37°C. Após dissociação, a suspensão celular foi colocada em DMEM com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina, centrifugada durante 7 min a 650g a uma temperatura de 4°C, quantificada com o auxílio de câmara de Neubauer e cultivada em placas de 24 poços sobre lamínulas (densidade celular de  $8 \times 10^4$  células/poço).

## **2. Obtenção dos parasitos:**

### **2.1. Taquizoítos**

Taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH, foram mantidos em camundongos fêmeas Suíço Webster, pesando entre 18 a 21g, através de passagens com inóculo intraperitoneal de  $10^5$  taquizoítos/animal. Após 48 a 72 h de infecção os parasitos foram coletados do exsudato peritoneal em PBS, pH 7.2. A suspensão celular foi centrifugada a 200g por 7 min. a temperatura ambiente para remoção das células sangüíneas e debris celulares. O sobrenadante contendo os parasitos foi centrifugado a 1000g por 10 min e o sedimento obtido, concentrado com taquizoítos de *T. gondii*, foi lavado 3 vezes em solução de PBS, pH 7.2. Os parasitos foram ressuspensos finalmente em meio DMEM sem SFB e quantificados em câmara de Neubauer ( $n^\circ$  de parasitos x diluição x  $10^4$ /ml) ao microscópio de luz, sob contraste de fase. Os parasitos foram usados imediatamente após a sua obtenção, sendo sua viabilidade celular verificada pelo teste de exclusão com 0,5 % de Azul de Trypan (T6146 Sigma-Aldrich).

### **2.2. Bradizoítos**

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

Em resumo, os cérebros dos camundongos foram isolados, lavados e homogeneizados em PBS, colocados em gradiente de 25% de Dextran, para purificação, objetivando separar os cistos dos debris celulares. Para obtenção de formas bradizoítas, os cistos foram incubados sob agitação por 1-5 min a 37°C, numa solução aquosa de pepsina ácida diluída na proporção pepsina ácida: cistos de 1:5 visando o rompimento da parede cística. Para neutralização da atividade

enzimática foi utilizada a solução de 1% carbonato de sódio e lavadas 3 vezes, em meio DMEM/Hams F12. O número de parasitos isolados foi determinado usando câmara de Neubauer e os parasitos foram imediatamente usados nos experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira. Para detalhes ver em Guimarães e colaboradores (2008).

### **3. Interação parasito-célula hospedeira:**

As culturas de linhagens celulares epiteliais de origem tanto de rato como de felinos foram semeadas em placas de 24 poços com cerca de  $8 \times 10^4$  células por poço. Após 24 h as culturas foram infectadas com bradizoítos ou taquizoítos de *T. gondii*.

Os ensaios de interação foram realizados na proporção de 1:5, 1:10 ou 1:20 (parasito-célula hospedeira) durante períodos que variaram de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias pós-infecção. Após lavagem em PBS, as amostras controles (não infectadas) e infectadas foram fixadas e processadas de acordo com os ensaios a serem desenvolvidos.

### **4. Ensaios de quantificação da infectividade**

As culturas celulares após 24, 48, 72 e 96 h de interação parasito-célula hospedeira foram fixadas em solução de Bouin por 5 min., lavadas com água destilada e coradas por 60 min. em solução de 10% Giemsa diluída em PBS. Após a coloração, as lamínulas foram desidratadas em bateria decrescente/crescente de acetona-xilol e montadas em resina Permunt (SP15-500 Fischer Scientific).

A análise quantitativa foi realizada a partir de três experimentos independentes nos períodos de 24, 48, 72 e 96 h de interação, em duplicata. Para essa análise foram contadas 400 células por experimento em pelo menos 10 campos aleatórios e então, considerados o percentual de: células infectadas, vacúolos parasitóforos (VP) e de estruturas semelhantes a cistos de *T. gondii* (CL).

A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio padrão (DP) sendo a análise estatística obtida pelo emprego do teste de Mann-Whitney e desdobramento através do teste de Student-Newman-Keuls com um Intervalo de confiança ao nível de significância de 0,5%.

## **5. Monitoramento dos estágios morfológicos evolutivos do *T. gondii***

A caracterização dos estágios evolutivos do *T. gondii* em culturas de linhagens epiteliais infectadas com formas bradizoítas, com relação de 1:10 (parasito-célula hospedeira), foi monitorada por meio de sondas. Para identificação de taquizoítos por imunomarcação foi utilizado o anticorpo anti-p30 (TP3 sc-52255 - Santa Cruz), que reconhece especificamente a proteína SAG1 encontrada na superfície externa da membrana plasmática deste estágio. Para identificação de cistos de *T. gondii* utilizamos a lectina Dolichos biflorus (DBA) conjugada a TRITC (L6533 Sigma-Aldrich), que se liga especificamente a grupamentos *N*-acetil-galactosamina presentes na parede cística (Zhang e cols. 2001). Inicialmente, as células nos períodos de 1 a 10 dias de infecção foram fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS durante 20 min a temperatura de 4°C, lavados 3 vezes durante 10 min. em PBS. Para bloquear os radicais aldeídos livres as células foram incubadas por 30 min em 50 mM cloreto amônia. Após o bloqueio, as células foram permeabilizadas por 20 min em PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% BSA (Sigma-Aldrich) para bloquear ligações inespecíficas. Para o ensaio de imunofluorescência indireta, as culturas foram incubadas durante 2 h a 37°C com anticorpo primário anti-p30 diluído 1:100 em PBS contendo 4% BSA. A seguir, as células foram lavadas com PBS contendo 4% BSA e reincubadas durante 1 h a 37°C com anticorpo secundário (IgG anti-camundongo conjugado com FITC-F5262) na diluição de 1:600 em PBS contendo 4% BSA. Para fluorescência direta foi utilizada a lectina DBA-TRITC (1:50). Após a lavagem em PBS, as culturas foram incubadas por 10 minutos com um intercalante de DNA, DAPI (4',6 - Diamidino - 2 - phenylindole, Sigma Chemical Co.D código 9542) diluído 1:1000 em PBS, lavadas uma vez em PBS, montadas em lâmina com DABCO (1,4 Diazabicyclo [2.2.2] octane - Triethylenediamine - "antifading", Sigma Chemical Co.código D 2522). Os controles das reações foram realizados na ausência do

anticorpo primário e para a lectina DBA foi realizado um ensaio de competição com a adição de 50 mM de *N*-acetil-galactosamina (GalNAc). As amostras foram analisadas com o microscópio de varredura confocal a laser (Axiovert 510, META, Zeiss, Alemanha) usando o laser 543 Hélio (LP560 filtro), laser 488 Argônio / Krypton (Ar/Kr) (filtro LP515) e o laser 405 Diiod (LP 420 filtro).

## **6. Análise ultraestrutural da interação parasito-célula hospedeira**

### **6.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para análise ultraestrutural, culturas de CRFK semi-confluentes foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 min. e infectadas na relação 1:10 (parasito-célula hospedeira) com formas bradizoítas de *T. gondii* por períodos que variaram de 1 a 14 dias de infecção. As culturas infectadas foram fixadas por 1 h a 4°C com 2,5% glutaraldeído (GA) diluído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (CACO) contendo 3,5% sacarose e 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.2). Após a fixação, as CRFK foram lavadas no mesmo tampão e, em seguida, pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>), diluído em 0,1 M de tampão CACO. As células foram então lavadas no mesmo tampão, destacadas do substrato com um raspador de células (“rubber policeman”) a 4°C e centrifugadas por 5 min a 10,000g. Posteriormente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina epóxi (Poly/Bed® 812 – polysciences). Cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo e examinados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011 da plataforma de microscopia eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

### **6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As lamínulas contendo as culturas de CRFK após cultivo de 1 a 13 dias de infecção foram fixadas por 30 min a temperatura ambiente em 2,5% GA diluído em 0,1M de tampão CACO contendo 3.5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> (pH 7.2). Após a lavagem, no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas por 30 min a

temperatura ambiente, em 1% OsO<sub>4</sub> diluído em 0,1M de tampão CACO desidratadas em bateria crescente de acetona e a secagem das amostras foi realizada pelo método do ponto crítico. As lamínulas foram montadas com cola de prata em suportes de alumínio e revestidos com uma camada de ouro na espessura de 20 nm. As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV com aceleração de voltagem de 15 kV da plataforma de microscopia eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC – Fiocruz) e ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6490LV Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO.

Técnicas de retirada da membrana da célula hospedeira com ajuda de fita adesiva logo após secagem pelo ponto crítico foram empregadas, a fim de, visualizar o interior das células com alta resolução pela MEV, o que possibilitou o estudo do destino intracelular do parasito em linhagem de células CRFK ao longo de 1 a 13 dias de interação *T. gondii*-célula hospedeira.

# *Resultados*

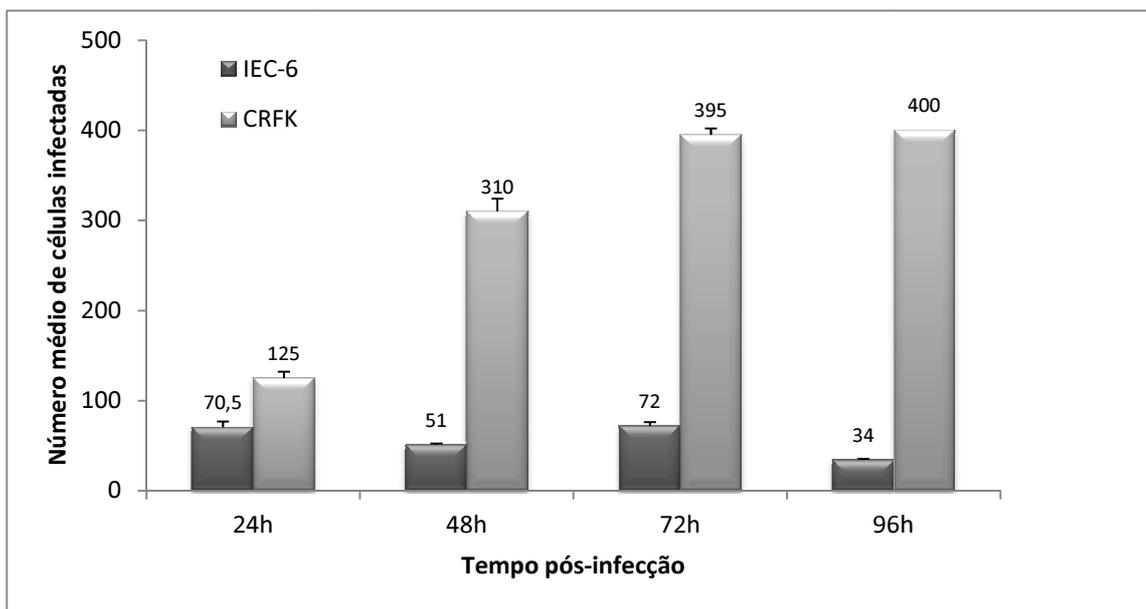
## IV. RESULTADOS

### 1. Análise da capacidade infectiva do *T. gondii* frente a duas linhagens de células epiteliais

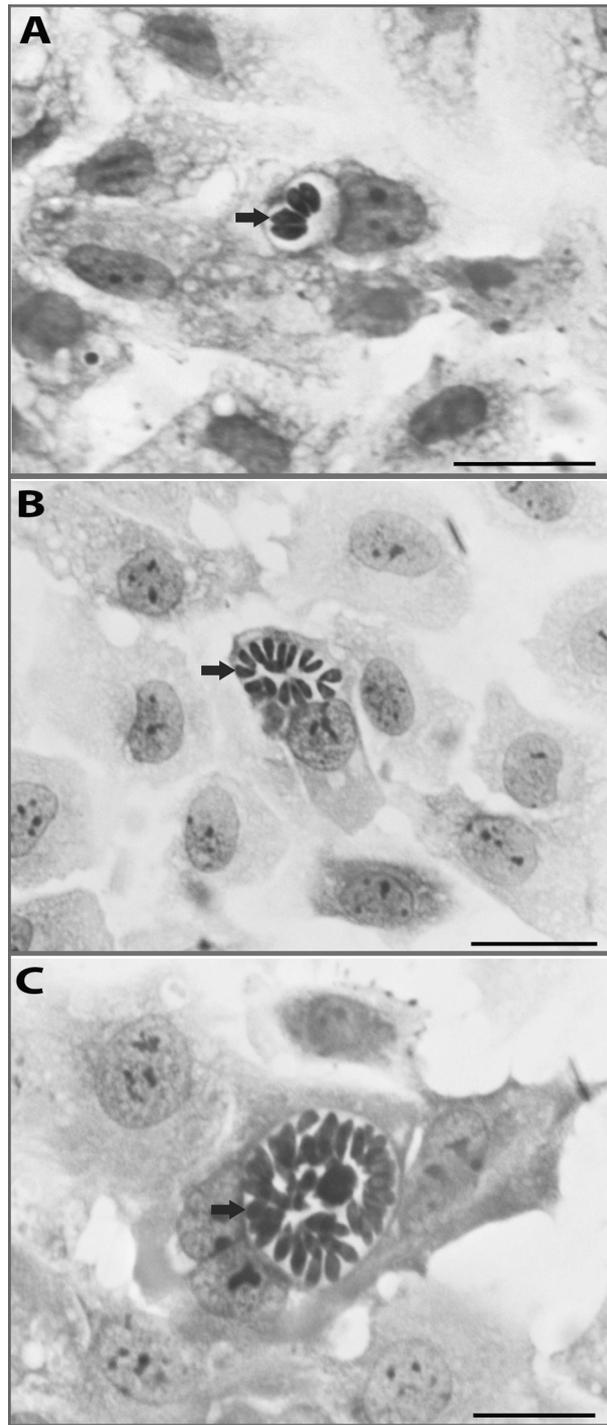
#### 1.1 Infectividade de taquizoítos do *T. gondii* da cepa RH frente à IEC-6 e CRFK.

A análise quantitativa da interação de taquizoítos de *T. gondii* e linhagem celular IEC-6 (relação 1:5 - parasito-célula hospedeira) foi realizada no período entre 24 e 96 h através da contagem de 400 células por experimento em pelo menos 10 campos aleatórios. Os resultados apontaram que com 24 h de interação o número médio de células infectadas foi 70.5, observando-se um decaimento da infecção já nas 48 h de interação, atingindo valores de 34 células infectadas ao final de 96 h (Fig. 1). Considerando-se que o  $n$  dos experimentos foi pequeno, esses dados quantitativos deverão ser ainda confirmados. As imagens dessas culturas mostraram poucos parasitos intracelulares, compatível com o tempo de infecção de 24 h (Fig. 2A); com 48 h de interação presença de vacúolos contendo rosetas (Fig. 2B) e com 96 h um grande número de parasitos no interior de vacúolos representativo de um processo ativo de multiplicação por endodiogenia (Fig. 2C).

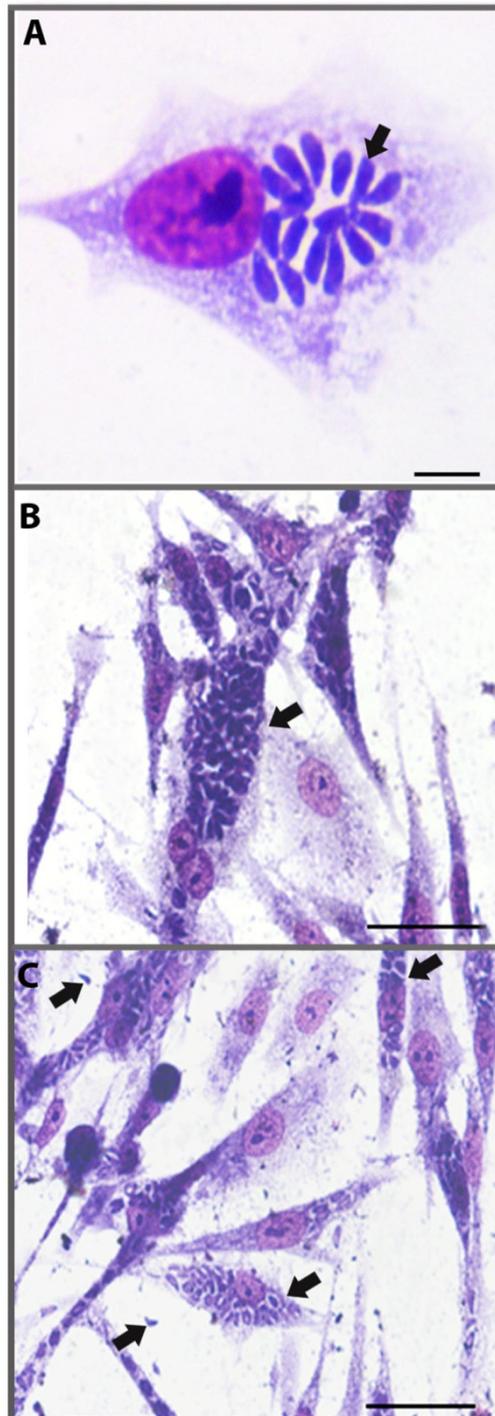
A análise quantitativa da interação de taquizoítos de *T. gondii* e a linhagem celular CRFK empregando a relação parasito-célula de 1:5, durante os mesmos períodos de infecção, mostrou que diferentemente da linhagem IEC-6, durante as primeiras 24 h de interação, cerca de 125 células encontravam-se infectadas. A partir de 48 h o número médio de células infectadas aumentou mais do que três vezes, e assim, praticamente todas as células encontraram-se infectadas ao final de 96 h (Fig. 1). Culturas infectadas por 24 h e coradas pelo Giemsa mostraram parasitos intracelulares já em forma de roseta (Fig. 3A) indicativo de processo ativo de divisão celular. A partir de 48 h foram observadas células com vacúolos parasitóforos apresentando muitos parasitos no seu interior e sendo já detectados parasitos livres no meio extracelular e debris celulares, confirmando assim o rompimento de células decorrente do ciclo lítico do *T. gondii* (Fig. 3B e C). A análise estatística da infectividade entre as duas linhagens celulares não foi realizada, tendo em vista o baixo número de amostras de IEC-6 infectadas com taquizoítos.



**Figura 1:** Número médio de células IEC-6 e CRFK infectadas com taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, utilizando-se carga infectiva de 1:5 (parasito-célula hospedeira).



**Figura 2: Culturas de IEC-6 infectadas com taquizoítos de *T. gondii*.** (A) Dois pares de parasitos em uma única célula, indicativo de replicação por endodiogenia, com 24 h de infecção; (B) Célula apresentando um VP com parasitos em forma de rosetas, com 48 h de infecção; (C) A partir de 72 h de infecção observa-se uma célula com VP contendo numerosos parasitos entre células não infectadas [Bar= 20 $\mu$ m].



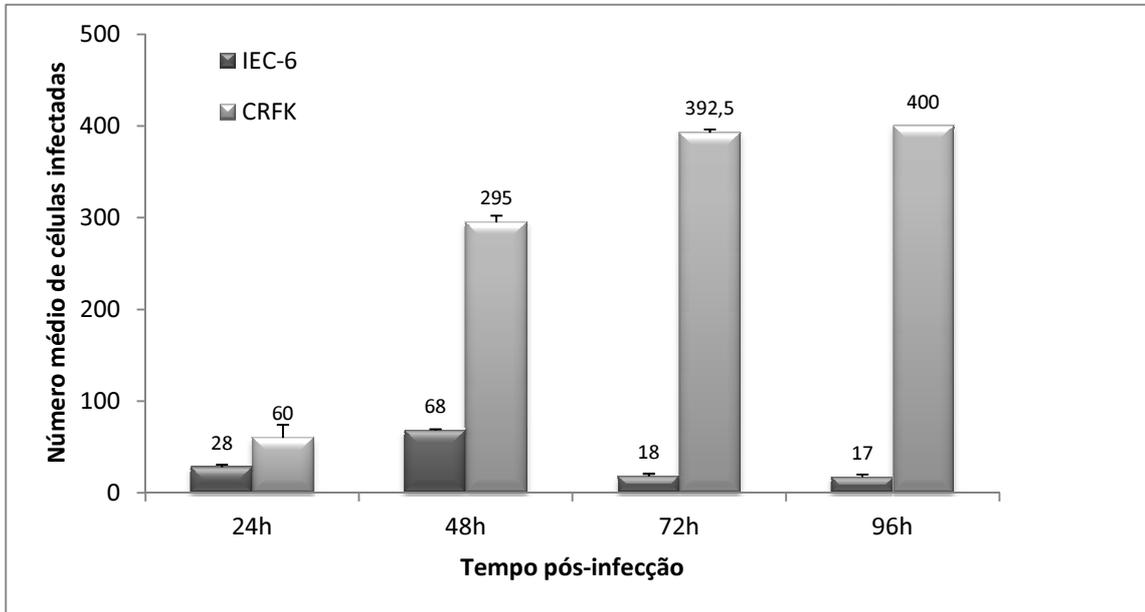
**Figura 3: CRFK infectada com taquizoítos de *T. gondii*.** (A) A partir de 24 h de infecção foi observada a presença de parasitos em forma de roseta (seta) [Bar= 10 $\mu$ m]; (B) Com 48 h de infecção a maioria das células se encontrava infectada com diversos parasitos intracelulares (seta); (C) Neste tempo de infecção foram ainda observados parasitos intracelulares e também no meio extracelular (setas), proveniente do rompimento de outras células infectadas [Bar= 50 $\mu$ m].

A infecção de células IEC-6 com taquizoítos empregando relações mais baixas 1:10 e 1:20 (parasito-célula hospedeira), mostrou que após 48 h ocorreu um declínio do número médio de células infectadas nessas culturas, sendo ainda mais acentuado na relação 1:20 (Fig. 4 e 5).

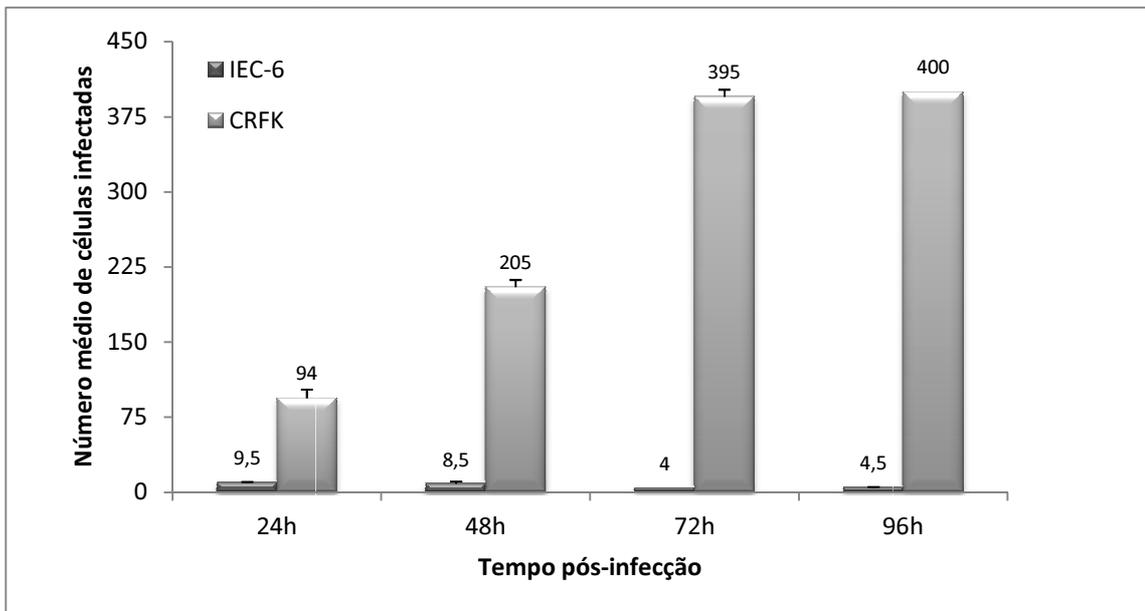
A interação de taquizoítos de *T. gondii* e cultura de células CRFK empregando as relações 1:10 e 1:20, não mostrou diferenças significativas quanto ao número médio de células infectadas, a partir de 48 h de interação entre as três cargas parasitárias (Fig. 1, 4 e 5). Com relação às cargas infectivas, em particular a de 1:10 foi demonstrado que nas culturas o número de células infectadas aumentou cerca de 5 vezes à semelhança do que foi observado empregando-se a relação de 1:5, com 24 h de interação. A maioria das células encontrou-se infectada quando analisadas após 48 h de infecção.

### **1.2 Infectividade de bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 frente às células IEC-6 e CRFK**

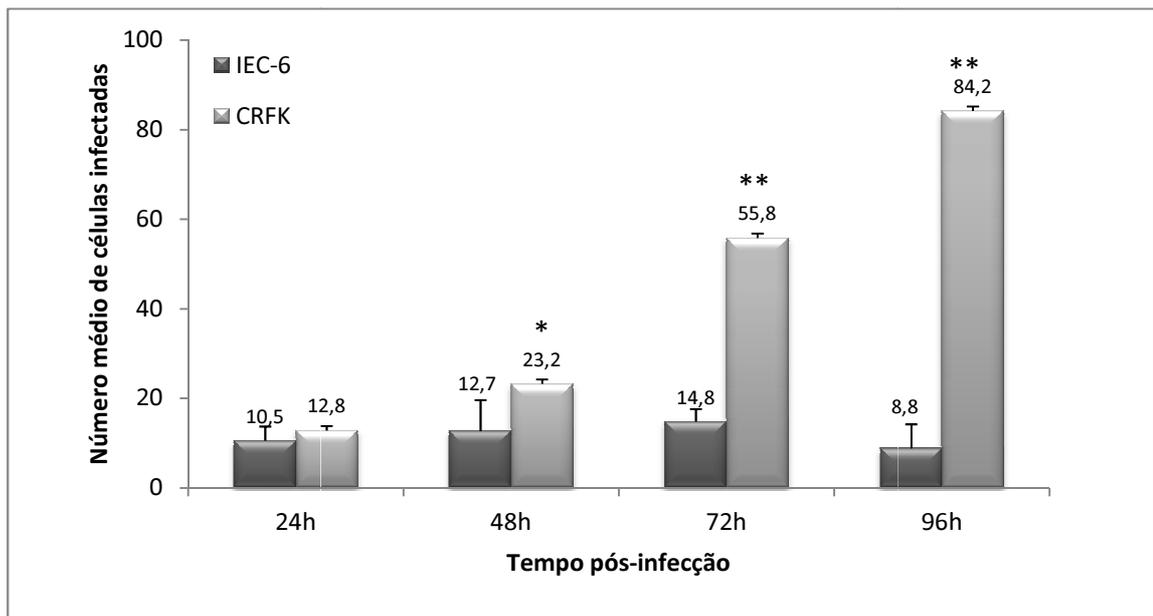
A análise quantitativa da interação de bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 frente à linhagem IEC-6 empregando a carga infectiva de 1:5 (parasito-célula hospedeira) foi realizada calculando-se a média e o desvio padrão do número de células infectadas encontradas durante o período de 24 até 96 h de infecção. Aos resultados obtidos aplicou-se o teste Mann-Whitney, com intervalo de confiança ao nível de significância de 5%. O número médio de células infectadas se manteve praticamente constante até 72 h de infecção e após este período ocorreu um leve declínio (Fig. 6). A análise com a linhagem CRFK, diferentemente da IEC-6, apresentou um aumento do número médio de células infectadas, principalmente após 48 horas de infecção (Fig. 6).



**Figura 4:** Número médio de células IEC-6 e CRFK infectadas com taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, utilizando-se carga infectiva de 1:10 (parasito-célula hospedeira).



**Figura 5:** Número médio de células IEC-6 e CRFK infectadas com taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, utilizando-se carga infectiva de 1:20 (parasito-célula hospedeira).

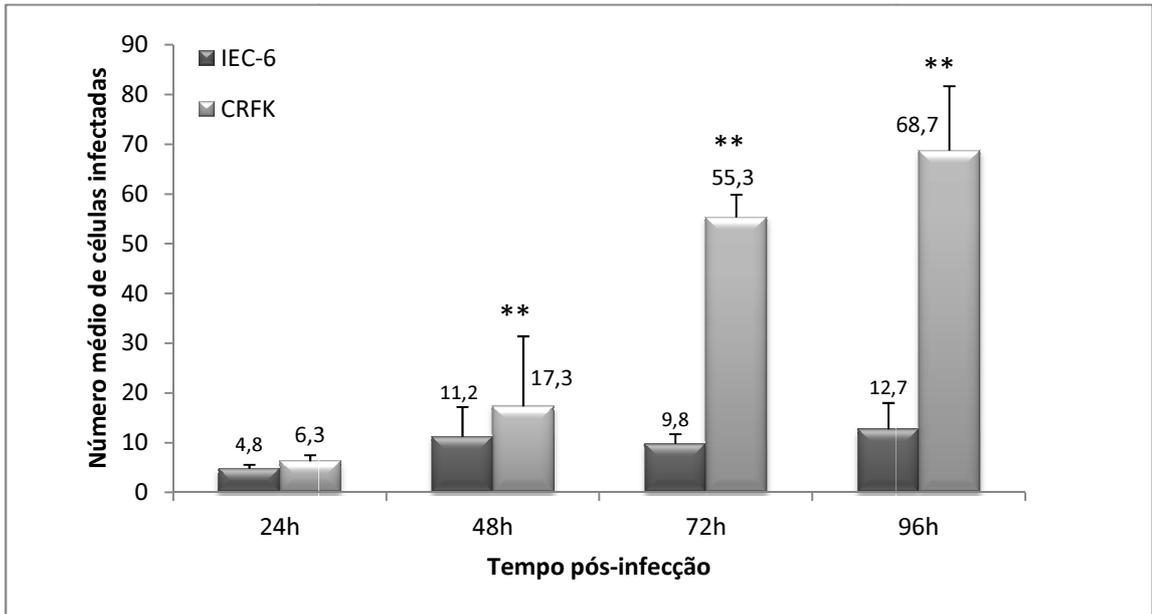


**Figura 6:** Número médio de células IEC-6 e CRFK infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 com a carga infectiva de 1:5 (parasito-célula hospedeira). \*  $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ .

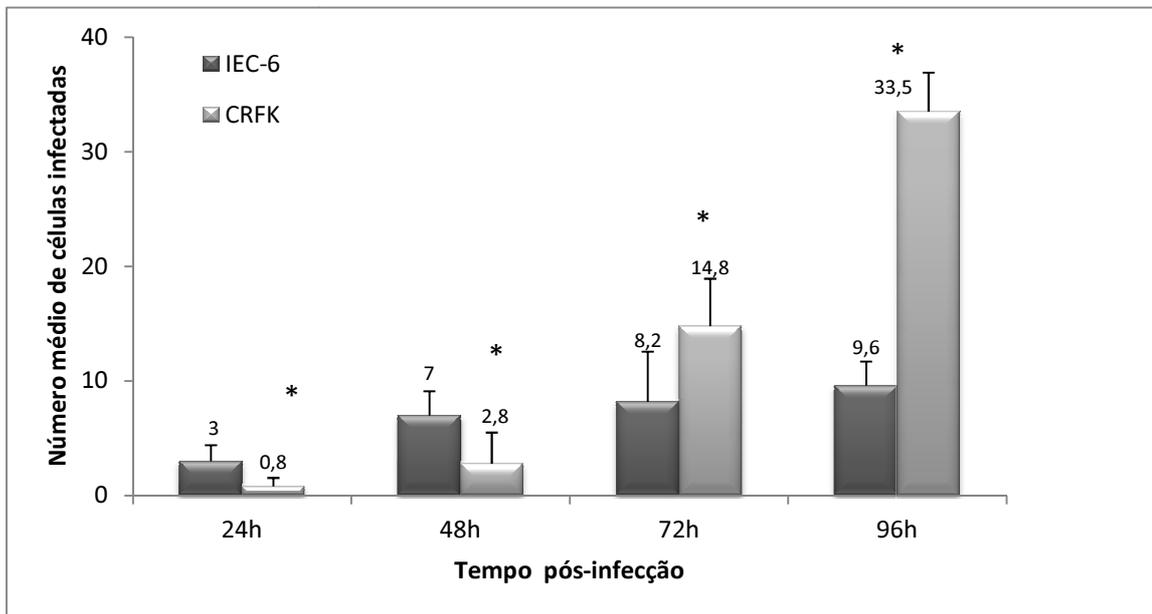
A análise quantitativa da interação dos bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 frente às culturas IEC-6 e CRFK, utilizando cargas infectivas mais baixas (1:10 e 1:20, relação parasito-célula hospedeira) também mostrou diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias de células infectadas (Fig. 7 e 8). As análises de infecção com a linhagem IEC-6 usando a relação de 1:10 mostrou que após 48 h, a infecção se manteve praticamente constante até 96 h (Fig. 7). Durante o estudo cinético de infecção, no período de 48 h foi observado um padrão de células apresentando vários vacúolos parasitóforos por célula, contendo somente um parasito no seu interior (Fig. 9A). Após 72 h foram observadas estruturas parasitárias organizadas a semelhança de cistos (Fig. 9B), porém não era tão comum quanto às rosetas observadas na maioria das células infectadas neste mesmo período (Fig. 9C). Com 96 h foram visualizadas células apresentando vacúolos contendo parasitos em dupla, em um cenário com poucas células infectadas, como ilustrado na figura 9D, indicativo do ciclo lítico do parasito e reinfecção de novas células nessas culturas. Ao empregar uma carga infectiva ainda mais baixa (1:20) foi observado um número médio de células IEC-6 infectadas menor do que o observado com a CRFK a partir de 72 h (Fig. 8). As análises com a linhagem CRFK, diferentemente da IEC-6 demonstraram um aumento crescente de infecção durante os períodos analisados, mostrando que essas diferenças de infectividade entre as linhagens celulares foram independentes da relação parasito-célula hospedeira utilizada.

Durante a análise de infectividade de bradizoítos frente às células CRFK e IEC-6 foi possível a observação de estruturas parasitárias organizadas à semelhança de formas císticas de *T. gondii*, “cisto-like” (CL). A linhagem de células CRFK foi a que mais apresentou essas formas, principalmente após 72 h de infecção (Fig. 10A-C). Essas estruturas foram ainda observadas após 144 h de infecção (Fig. 10C).

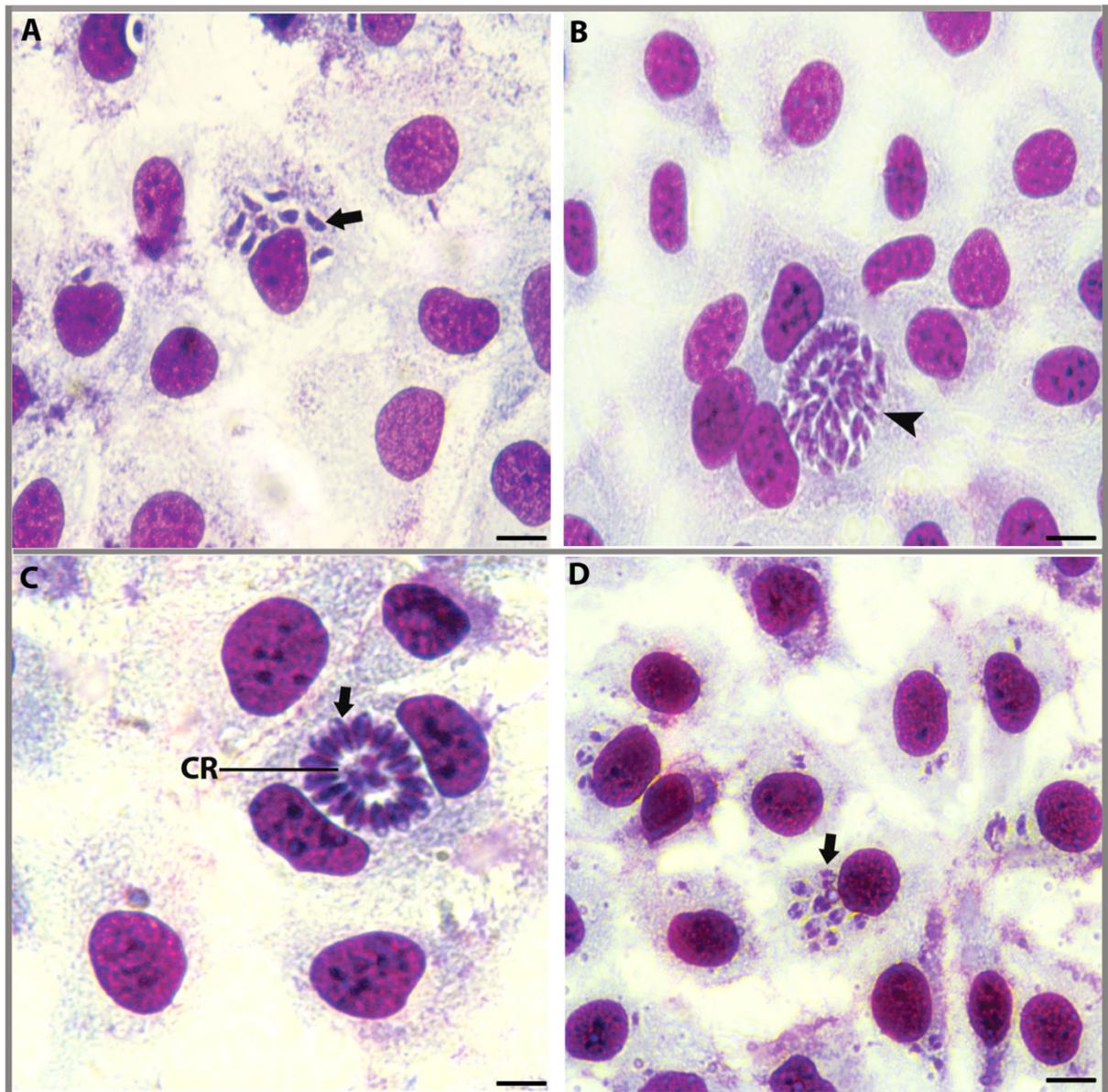
Uma análise comparativa da ocorrência de estruturas CL entre as duas células epiteliais mostrou que existem diferenças significativas através do teste Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). Esses dados mostram que as formas CL ocorreram com mais frequência na infecção das células CRFK, após 72 h de infecção, utilizando-se as cargas infectivas de 1:5 e 1:10 do que com as IEC-6 (Fig. 11 e 12).



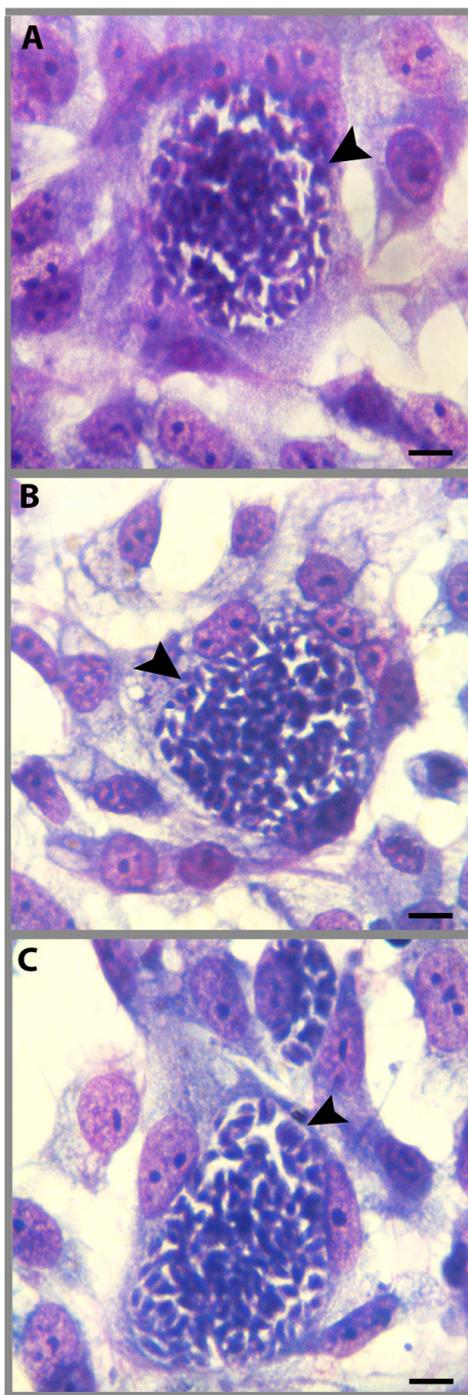
**Figura 7:** Número médio de IEC-6 e CRFK infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 com a carga infectiva de 1:10 (parasito-célula hospedeira). \*\* $p \leq 0,01$ .



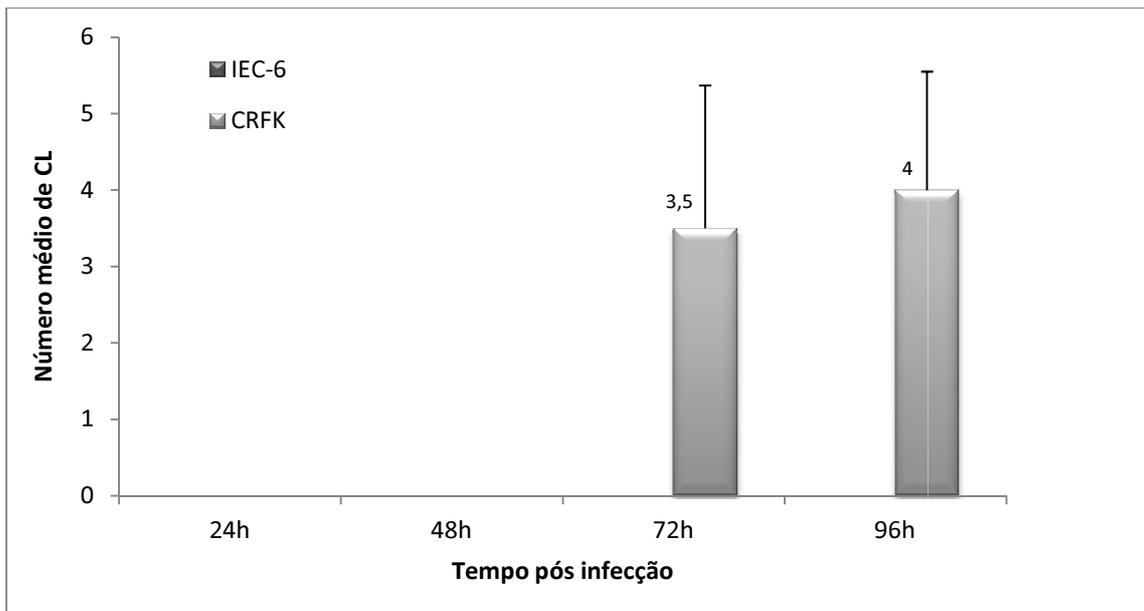
**Figure 8:** Número médio de IEC-6 e CRFK infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 com a carga infectiva de 1:20 (parasito-célula hospedeira). \* $p \leq 0,05$ .



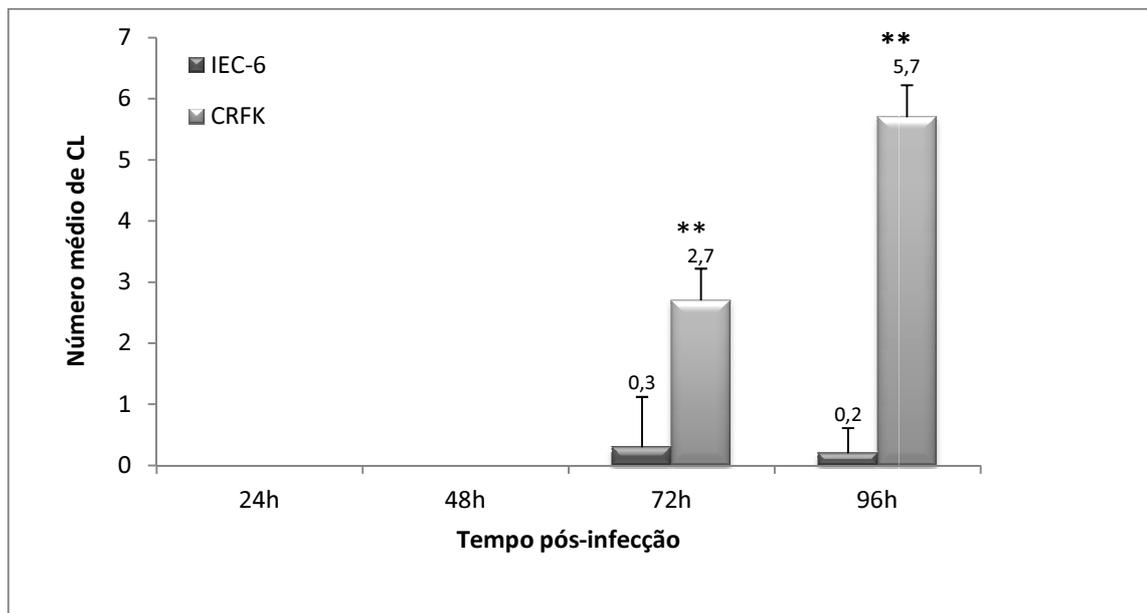
**Figura 9: Culturas de células IEC-6 infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49.** (A) Células apresentam vários VP com apenas um único parasito em cada VP em 48 h de infecção; (B) Com 72 h de interação foram observadas estruturas semelhantes a cistos (cabeça de seta), porém a maioria das estruturas encontradas se apresentava em forma de rosetas, como observado em C (seta) na qual foi possível identificar a presença de corpo residual (CR); (D) Com 96 h de interação, os parasitos foram visualizados em duplas, em VP individualizados dentro de uma mesma célula (seta). [Bar= 50µm]



**Figura 10: Culturas de CRFK infectadas com bradizoítos de *T. gondii* da cepa ME49.** Culturas infectadas e coloradas pelo Giemsa. (A) Estrutura semelhante a cistos após 72 h de interação (cabeça de seta); (B) Após 96 h de interação (cabeça de seta); (C) Após 144 horas de interação (cabeça de seta). [Bar= 20µm]



**Figura 11:** Número médio de CL em CRFK e IEC-6 infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 com a carga infectiva de 1:5 (parasito-célula hospedeira).



**Figura 12:** Número médio de CL em CRFK e IEC-6 infectadas com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 com a carga infectiva de 1:10 (parasito-célula hospedeira). \*\* $p \leq 0,01$

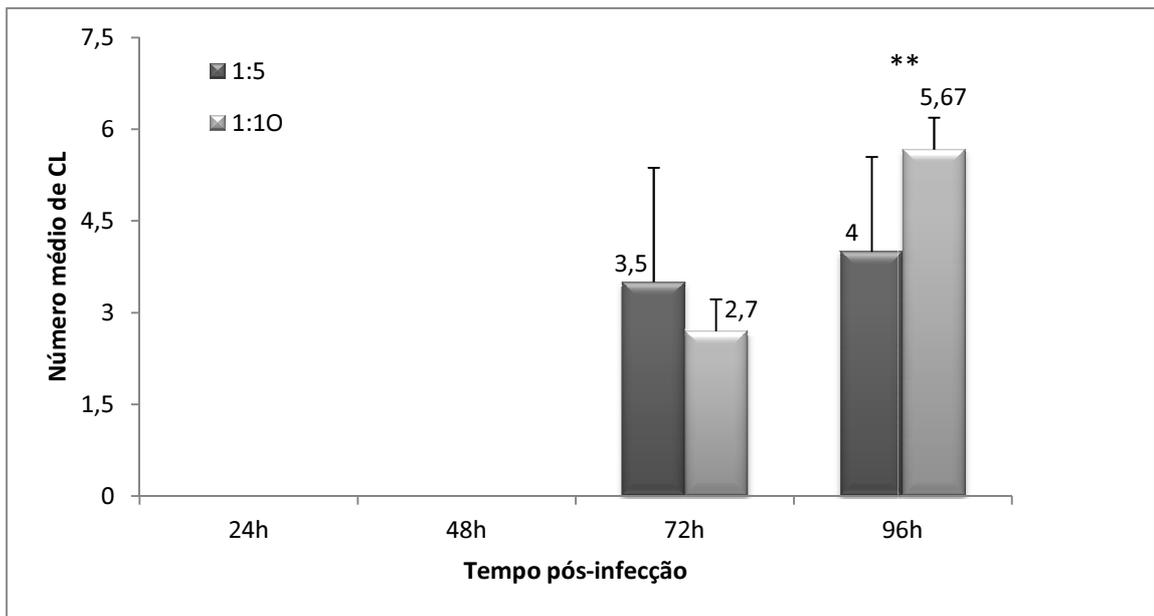
Após a verificação de que as formas CL foram mais freqüentes nas células CRFK com as cargas infectivas 1:5 e 1:10 realizou-se uma análise comparativa das médias de CL nas CRFK com as duas cargas infectivas, utilizando-se o teste Mann-Whitney. Os resultados estatísticos mostraram que existe diferença significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre as cargas infectivas, confirmando que com a carga de 1:10 foi observado um maior número de formas CL, a partir de 96 horas de infecção (Fig. 13).

## **2. Caracterização morfológica ultraestrutural de CRFK**

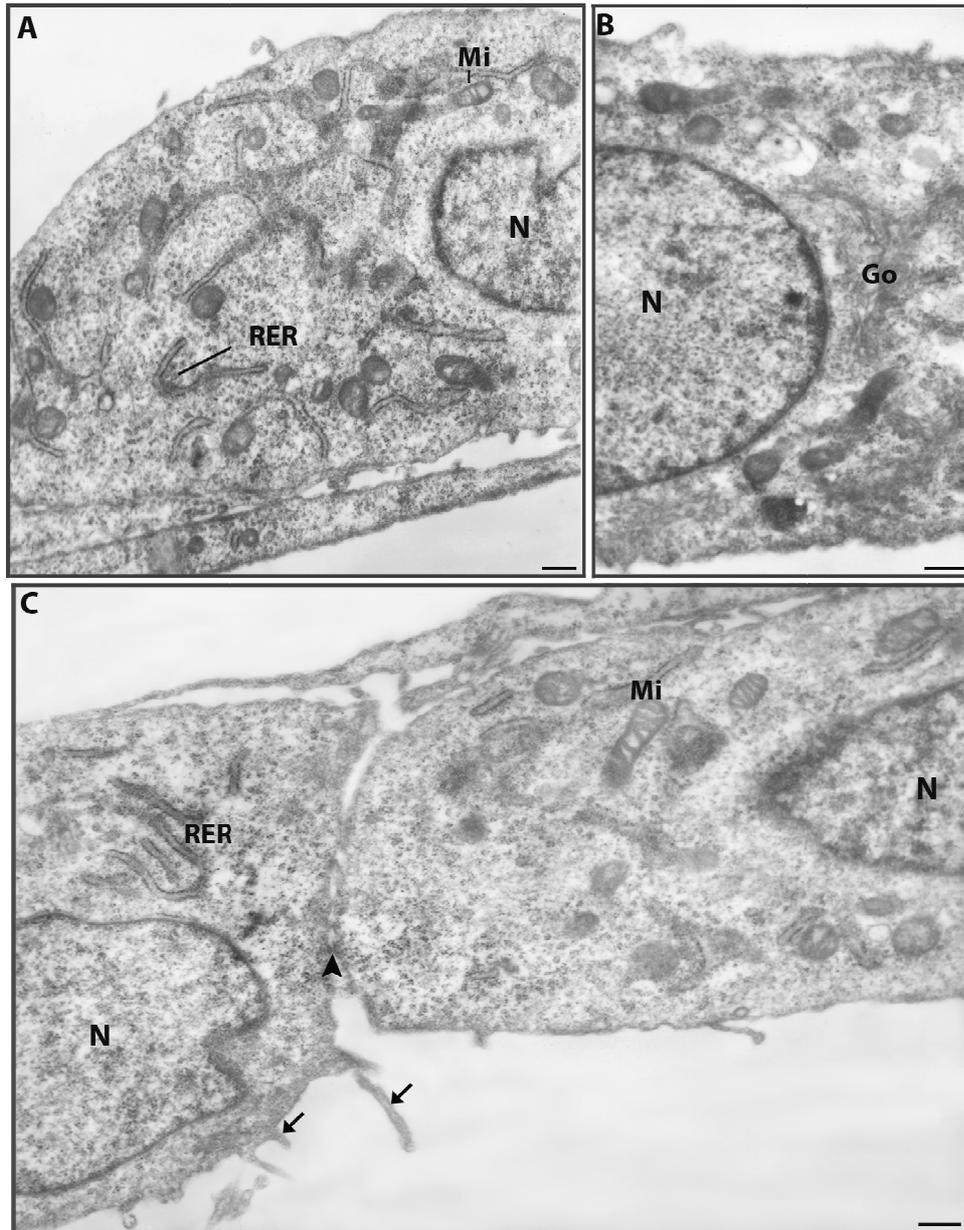
A linhagem celular CRFK foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). A análise ultraestrutural das culturas mostrou células com forma fusiforme, núcleo com cromatina concentrada preferencialmente na periferia da membrana interna do envoltório nuclear (Fig. 14) e nucléolo grande e centralizado (dado não mostrado). A principal característica foi retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido e disperso pelo citoplasma da célula, a presença de mitocôndrias pequenas com cristas transversais em relação ao eixo principal da célula, o Golgi próximo ao núcleo e a matriz celular pouco eletrondensa (Fig. 14A-B). A figura 14C mostra pontos de adesão entre células e filopódios de diferentes comprimentos.

A análise morfológica por MEV mostrou com 48 h de cultivo, células fusiformes organizadas lado a lado com distribuição paralela à semelhança do tecido *in vivo*, com a presença de filopódios curtos na superfície. A adesão ao substrato foi estabelecida através de expansões da membrana celular caracterizada por finos filopódios, que mantinham conexão com as células vizinhas (Fig. 15).

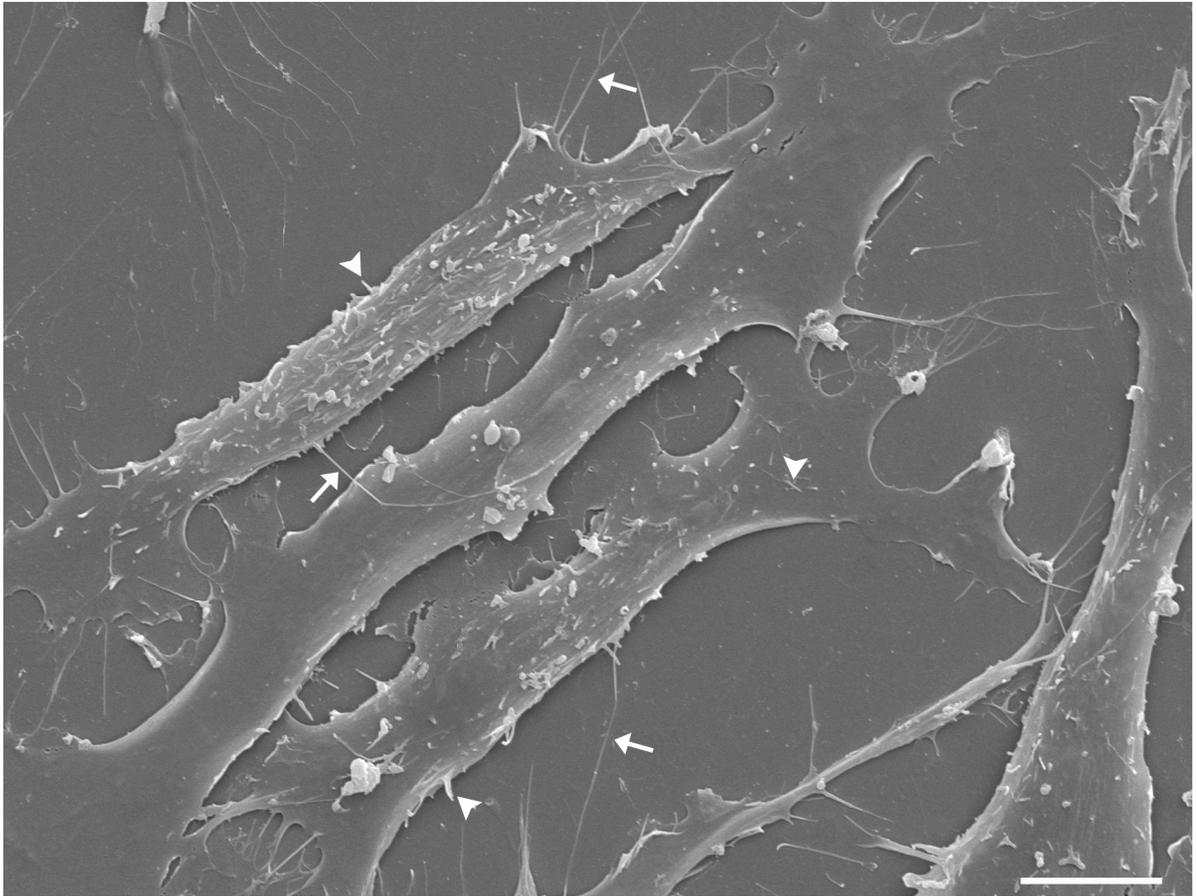
Células CRFK fixadas após 72 h de cultivo mostraram um aumento considerável de filopódios em toda superfície celular, estabelecendo também estreito contato com células vizinhas. Nessas células houve um aumento significativo do volume celular com a perda do aspecto fusiforme (Fig. 16A-B).



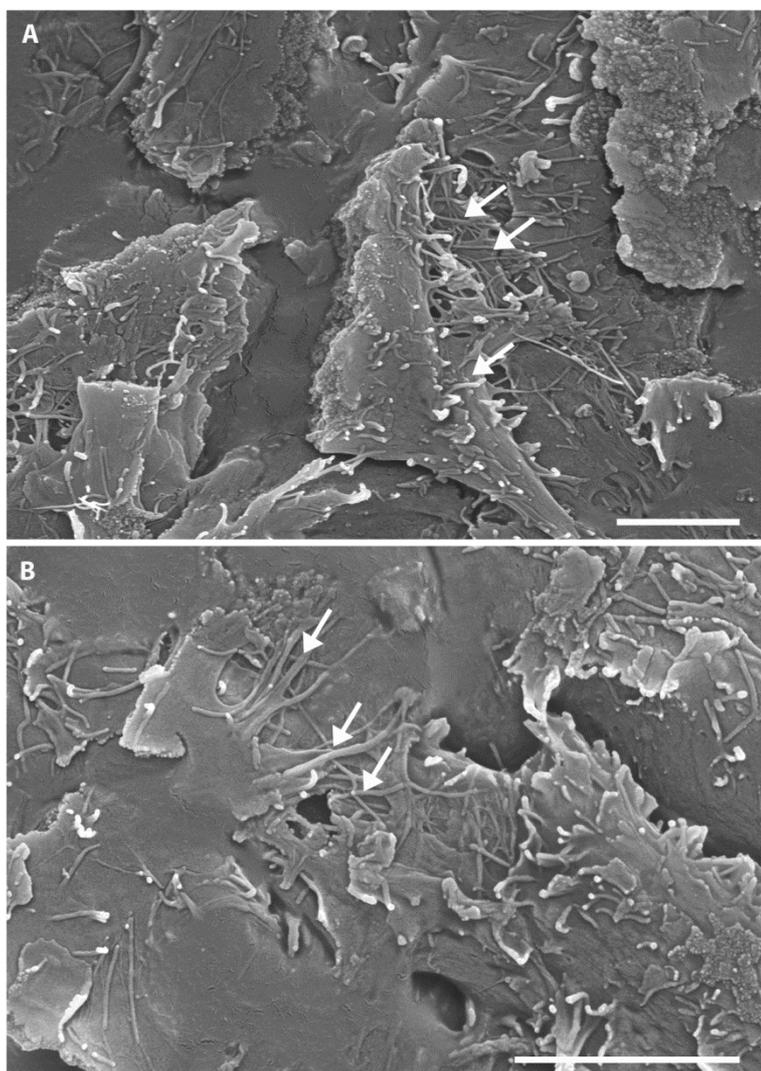
**Figura 13:** Número médio de CL em CRFK infectada com bradizoítos de *T. gondii* cepa ME49 com as cargas infectivas de 1:5 e 1:10 (parasito-célula hospedeira). \*\* = $p \leq 0,01$



**Figura 14: Morfologia ultraestrutural de CRFK por MET.** (A) Corte ultrafino mostra o núcleo da célula (N), mitocôndrias (Mi) e retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido e disperso pelo citoplasma; (B) Complexo de Golgi próximo ao núcleo (N); (C) Pontos de adesão entre as células (cabeça de seta), filopódios de diferentes comprimentos (setas finas) e mitocôndrias (Mi) com cristas transversais em relação ao eixo principal da célula. [Bar= 500nm]



**Figura 15: Morfologia ultraestrutural de células CRFK por MEV.** (A) CRFK com 48 horas de cultivo mostra células fusiformes organizadas lado a lado com distribuição paralela. Expansões da membrana celular caracterizada por filopódios finos e longos (setas) assim como, a presença de filopódios curtos na superfície da membrana plasmática (cabeça de seta). [Bar= 10 $\mu$ m]



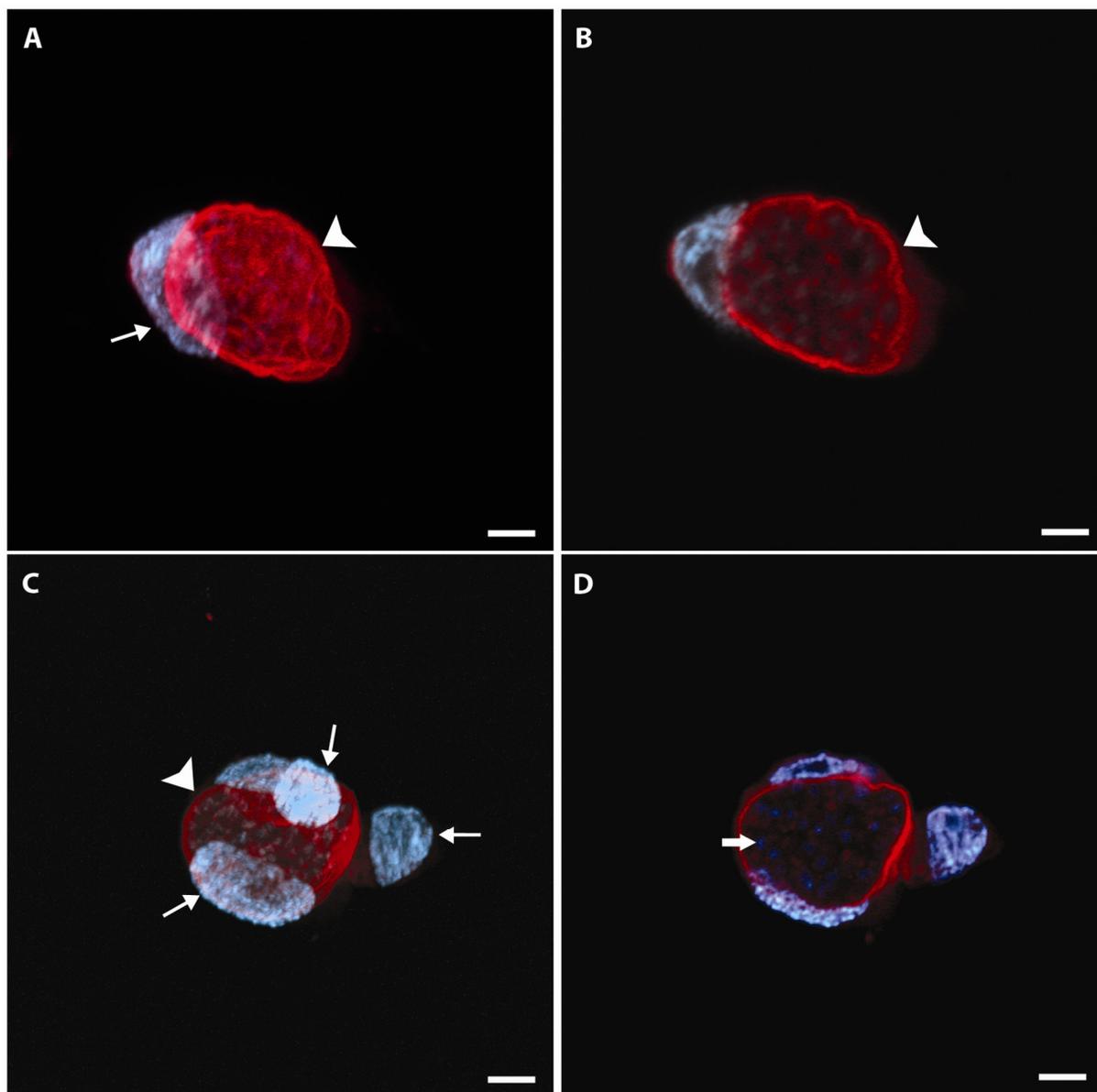
**Figura 16: Morfologia ultraestrutural de CRFK por MEV.** (A) CRFK com 72 horas de cultivo apresentam filopódios longos em toda superfície celular (seta); (B) Observam-se filopódios estabelecendo contato entre as células (seta). [Bar= 5 $\mu$ m]

### **3. Caracterização da interação de bradizóitos de *T. gondii*-CRFK**

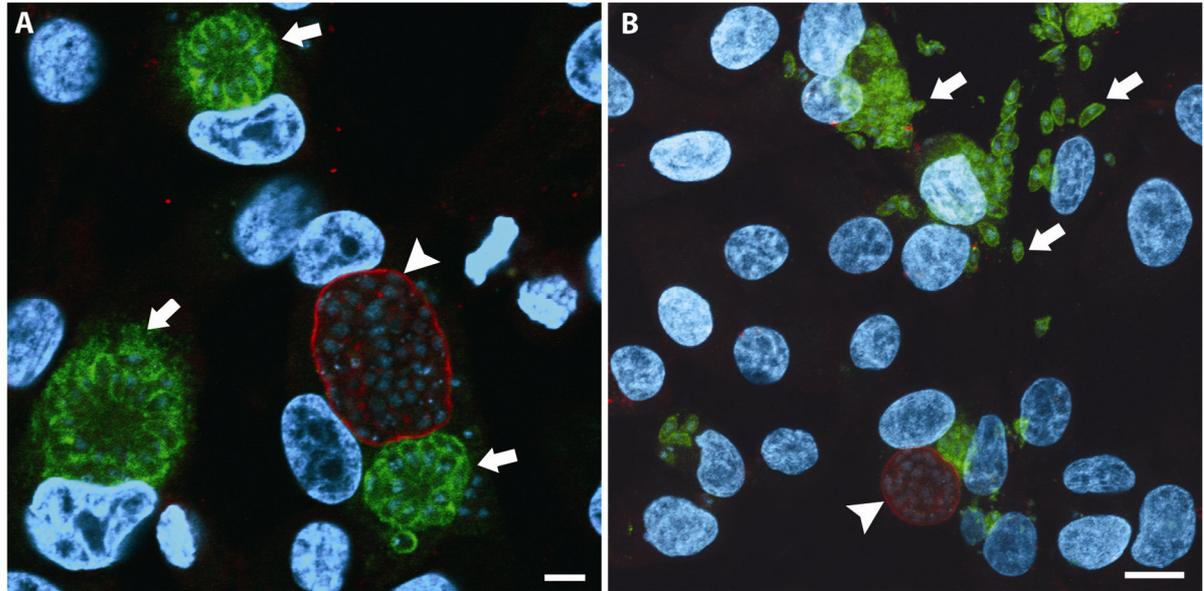
Para a caracterização do destino intracelular de bradizóitos em CRFK, técnicas de citoquímica e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) foram empregadas. Para este estudo elegemos as células CRFK e a relação parasito-célula hospedeira (1:10) como as condições mais favoráveis para o monitoramento da cistogênese de *T. gondii*, com base nos resultados obtidos a partir do estudo cinético.

#### **3.1 Imunomarcção**

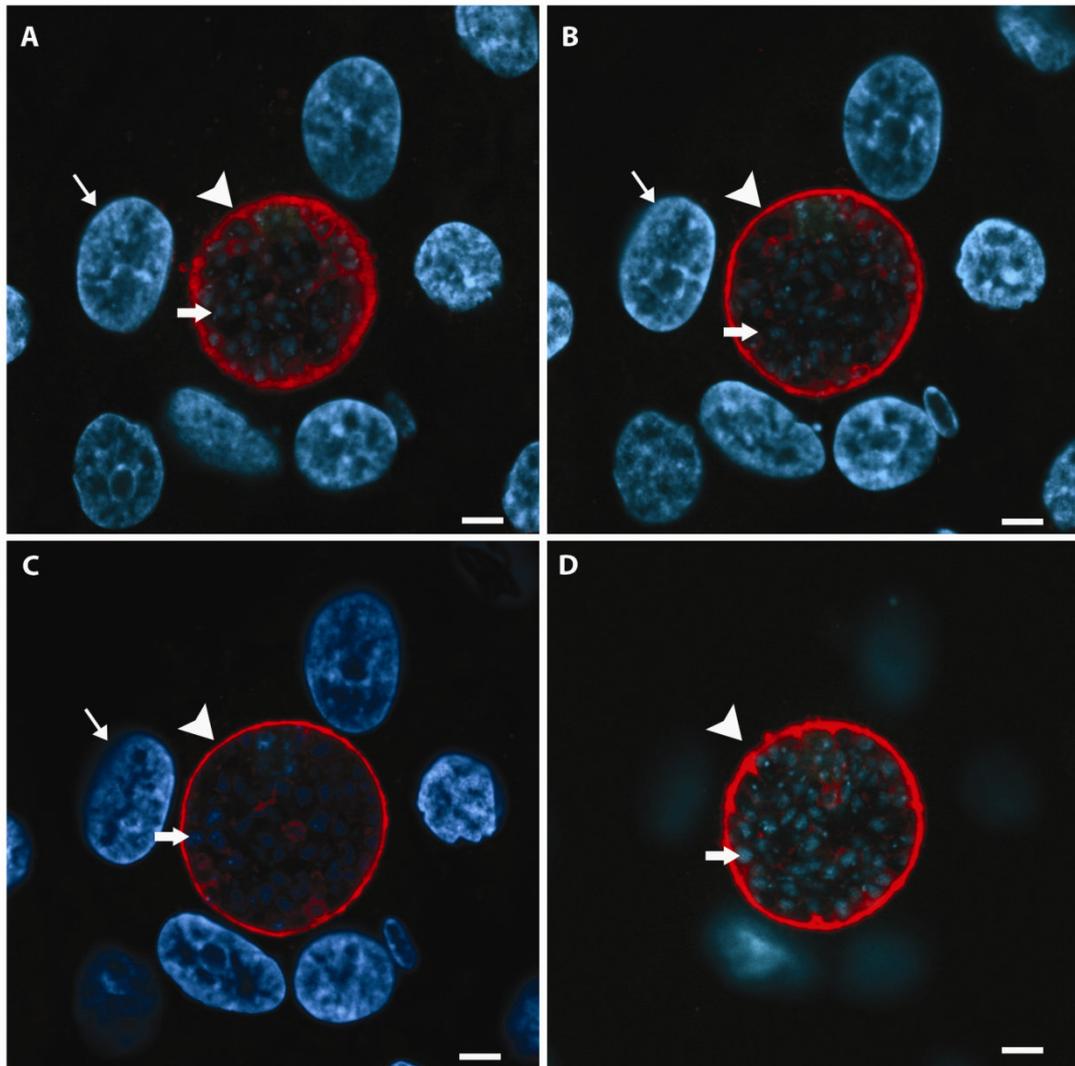
Os ensaios de imunofluorescência confirmaram através da incubação das células com a lectina DBA, a formação de cistos de *T. gondii* após 10 dias nas culturas de CRFK infectadas com bradizóitos empregando a relação de 1:10 (Fig. 17 A-D). A ocorrência de células contendo cistos foi independente de manobras químicas ou físicas que induzissem a cistogênese, estabelecendo-se espontaneamente. Em culturas mantidas infectadas por 11 dias, células contendo cistos foram visualizadas ao lado de células repletas de taquizóitos em forma de rosetas ou mesmo, com alguns taquizóitos livres no meio extracelular, como revelado pelo anticorpo anti-P30 (Fig. 18 A e B). No nosso sistema, os cistos foram analisados até 13 dias de infecção (Fig. 19A-D).



**Figura 17: Cistos de *T. gondii* em CRFK após 10 dias de infecção.** (A) Reconstrução de cortes de um cisto (cabeça de seta) confirmado por imunomarcção com lectina DBA conjugada a TRITC e DAPI revelando o núcleo da célula hospedeira (seta fina); (B) Outro corte do mesmo cisto (cabeça de seta) como observado em A; (C) Outro cisto revelado por DBA-TRITC (cabeça de seta) encontrado entre os núcleos de três células hospedeiras, como observado pelo DAPI (setas finas); (D) Corte do mesmo cisto observado em C, mostra a presença dos parasitos no interior do cisto, visualizados através da marcação dos núcleos com DAPI (seta grossa). [Bar= 5µm]



**Figura 18: Cistos de *T. gondii* após 11 dias de infecção.** (A) Cisto observado através da marcação com a lectina DBA conjugada a TRITC após 11 dias de interação (cabeça de seta). Tachyzoitos foram observados em formas de rosetas através do anticorpo anti-P30 conjugado a FITC (setas grossas). Os núcleos das células e dos parasitos foram visualizados através do DAPI; (B) Muitos tachyzoitos foram observados no meio extracelular (setas grossas). No mesmo campo microscópico pode-se observar um cisto de *T. gondii* em vermelho (cabeça de seta). [Bar= 10 $\mu$ m].

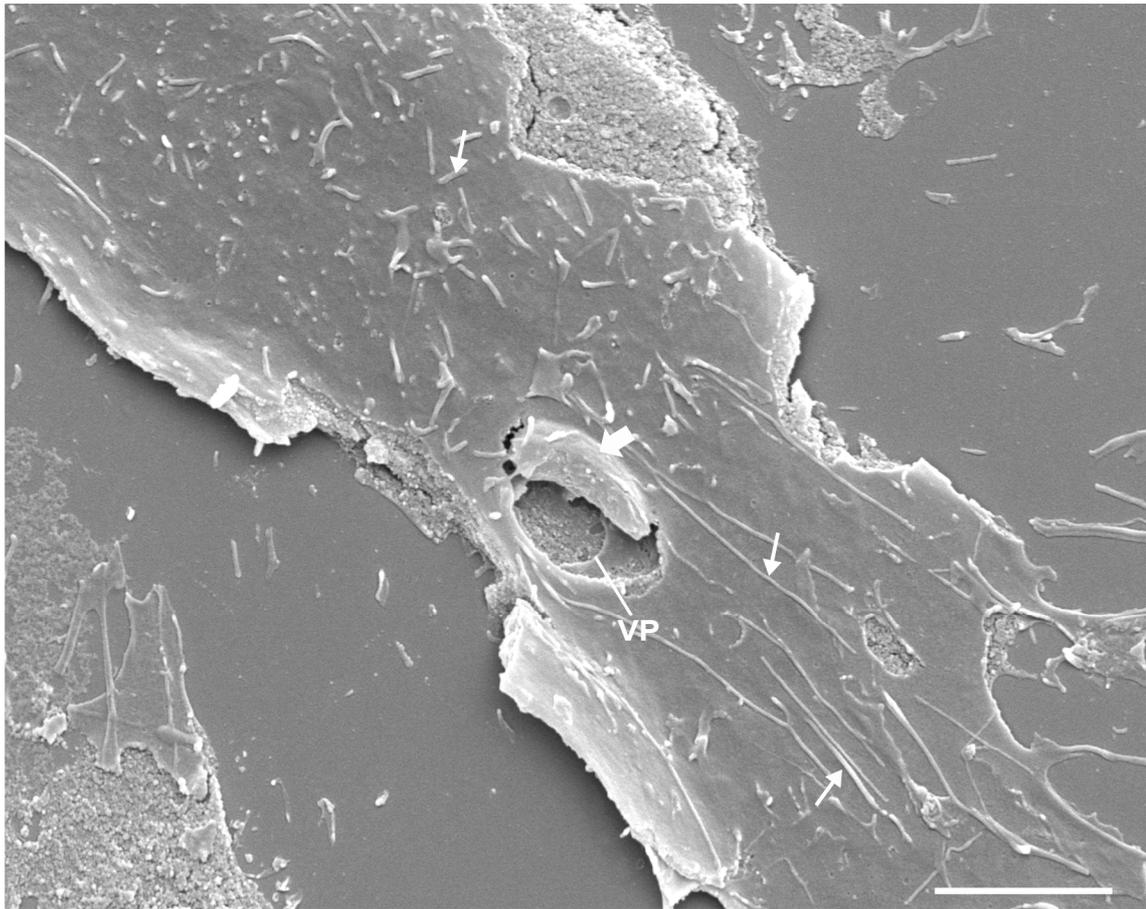


**Figura 19: Cistos de *T. gondii* em CRFK após 13 dias de infecção. (A-D)** Cortes seriados de um mesmo cisto (cabeça de seta) revelado com lectina DBA-TRITC mostrando claramente a marcação da parede cística (em vermelho). As setas grossas apontam para os núcleos dos parasitos revelados com DAPI e as setas finas apontam para os núcleos das células hospedeiras (em azul). [Bar= 5 $\mu$ m]

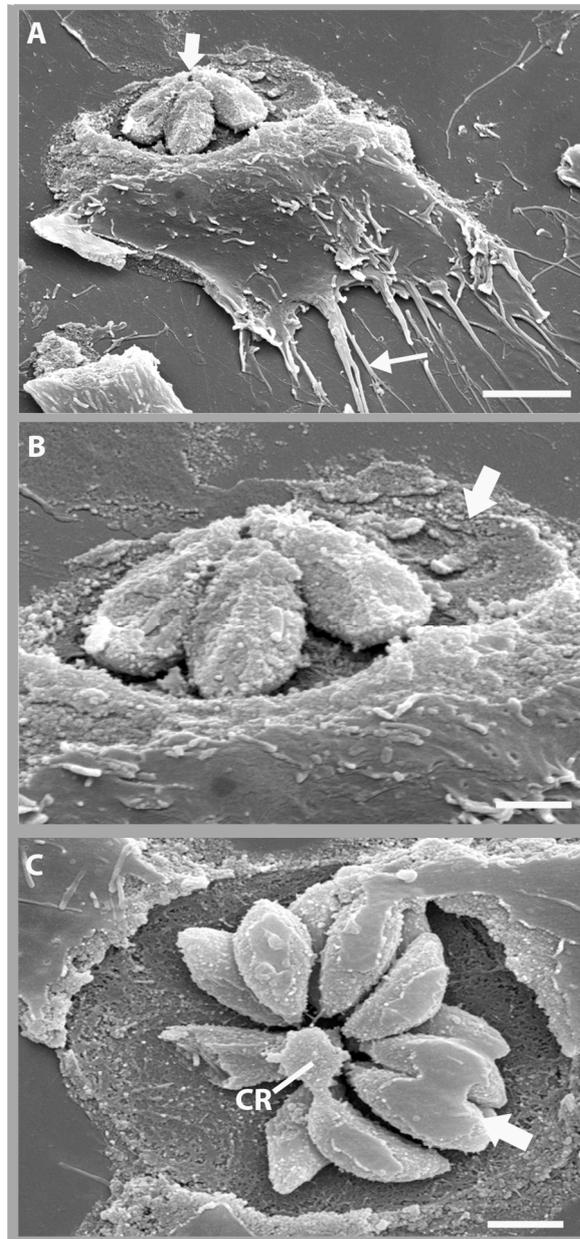
### **3.2. Análise ultraestrutural durante a interação de *T. gondii*-células epiteliais**

As análises ultraestruturais em alta resolução por MEV permitiram a visualização de parasitos no interior das células desde 24 h até 13 dias de infecção. A partir de 24 h de infecção foi possível a visualização de um único parasito no interior do vacúolo parasitóforo (VP) e a célula CRFK apresentando projeção de filopódios característicos de células epiteliais (Figura 20).

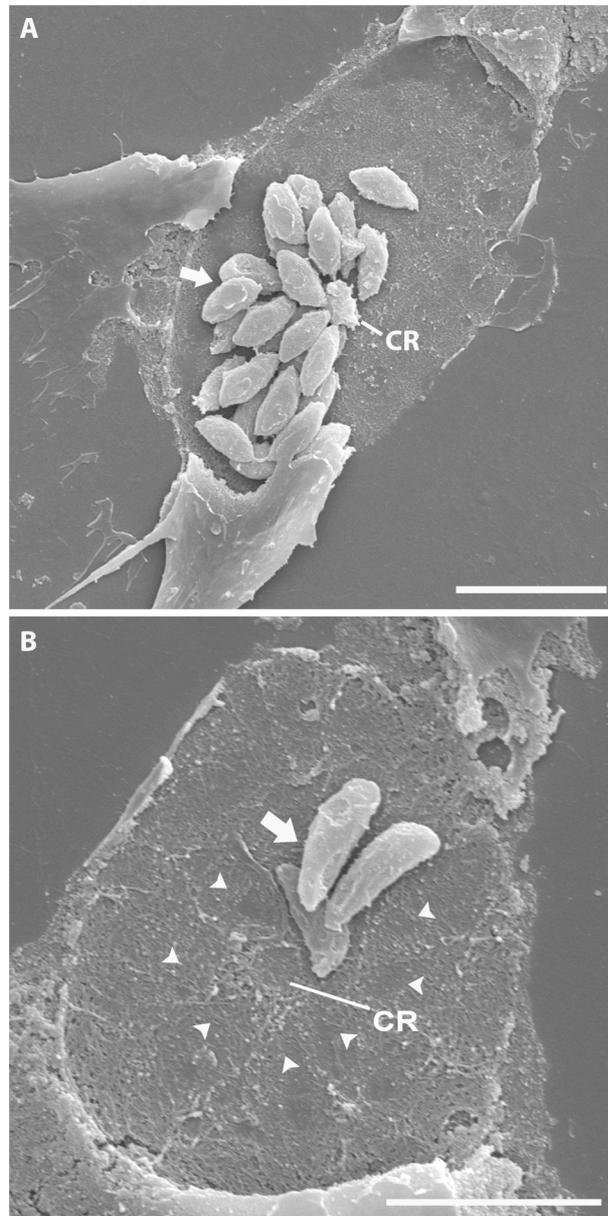
A partir de 48 h foram identificados VP com a presença de 3 parasitos e a imagem da impressão de um quarto parasito, que possivelmente foi retirado durante a aplicação da técnica da fita adesiva (Fig. 21A-B). Em outra célula infectada foi possível a visualização de parasitos em forma clássica de roseta com a presença do corpo residual entre os parasitos (Fig. 21C). Outras células apresentaram VP mais volumosos, com maior quantidade de parasitos, formando rosetas (Fig. 22A). A técnica da extração da membrana celular com fita adesiva permitiu observar a variabilidade de tamanhos de VP e o grande número de parasitos, constituindo rosetas e na região central um “imprint” do corpo residual (Fig. 22B).



**Figura 20: Vacúolo de *T. gondii* após 24 h de interação.** Observa-se um único parasito no interior do vacúolo parasitóforo (VP) (seta larga). A membrana da célula CRFK apresentou filopódios curtos e longos por toda a sua superfície (setas finas) [Bar= 2 $\mu$ m].

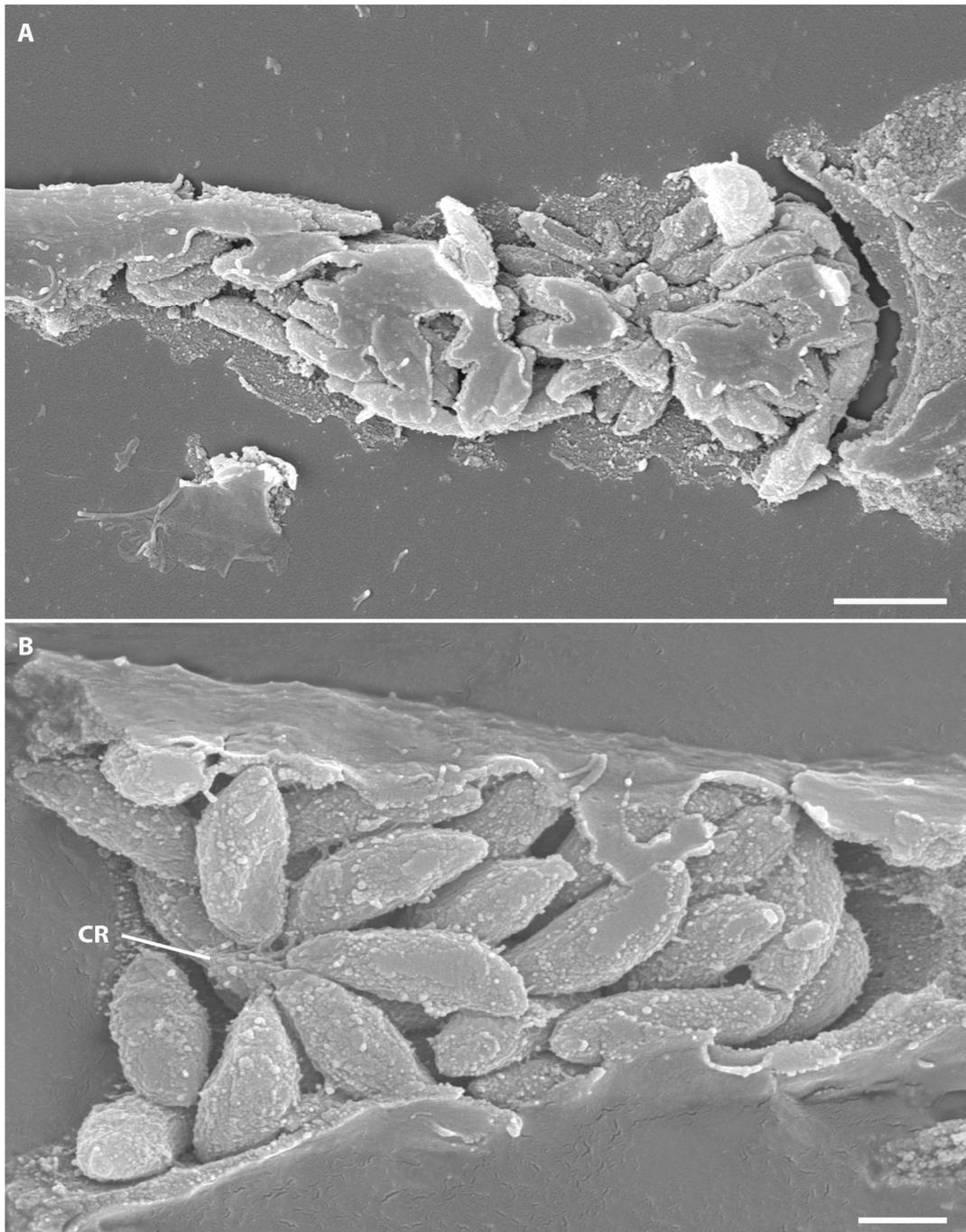


**Figura 21: Rosetas de *T. gondii* após 48 h de interação.** (A) VP com a presença de 3 parasitos (seta grossa) em uma célula que mostra longos e finos filopódios (seta fina) [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) Detalhe da célula observada em A, onde se vê o contorno do corpo de um quarto parasito neste VP (seta); (C) VP mostra parasitos (seta) em forma clássica de roseta com a presença do corpo residual (CR). [Bar= 2 $\mu$ m]

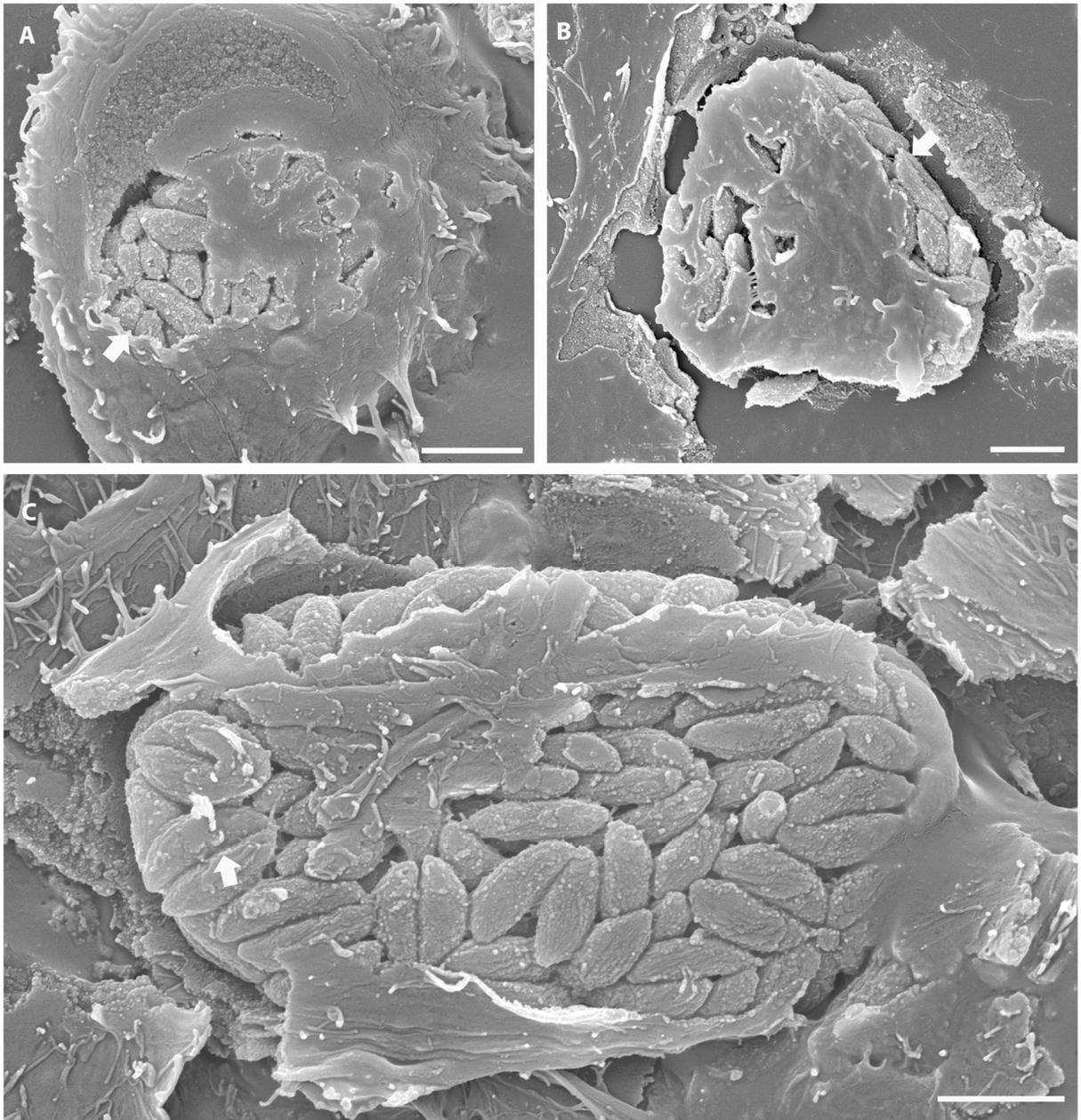


**Figura 22: Vacúolos de *T. gondii* após 48 horas de infecção.** (A) VP mostra diversos parasitos (seta) em forma de rosetas com a presença de corpo residual (CR); (B) Outro VP mostra três parasitos (seta grossa) e a impressão (molde) de outros que estariam compondo este VP em forma de rosetas (cabeças de setas). Nota-se o “imprint” do corpo residual (CR) presente neste VP. [Bar= 10µm]

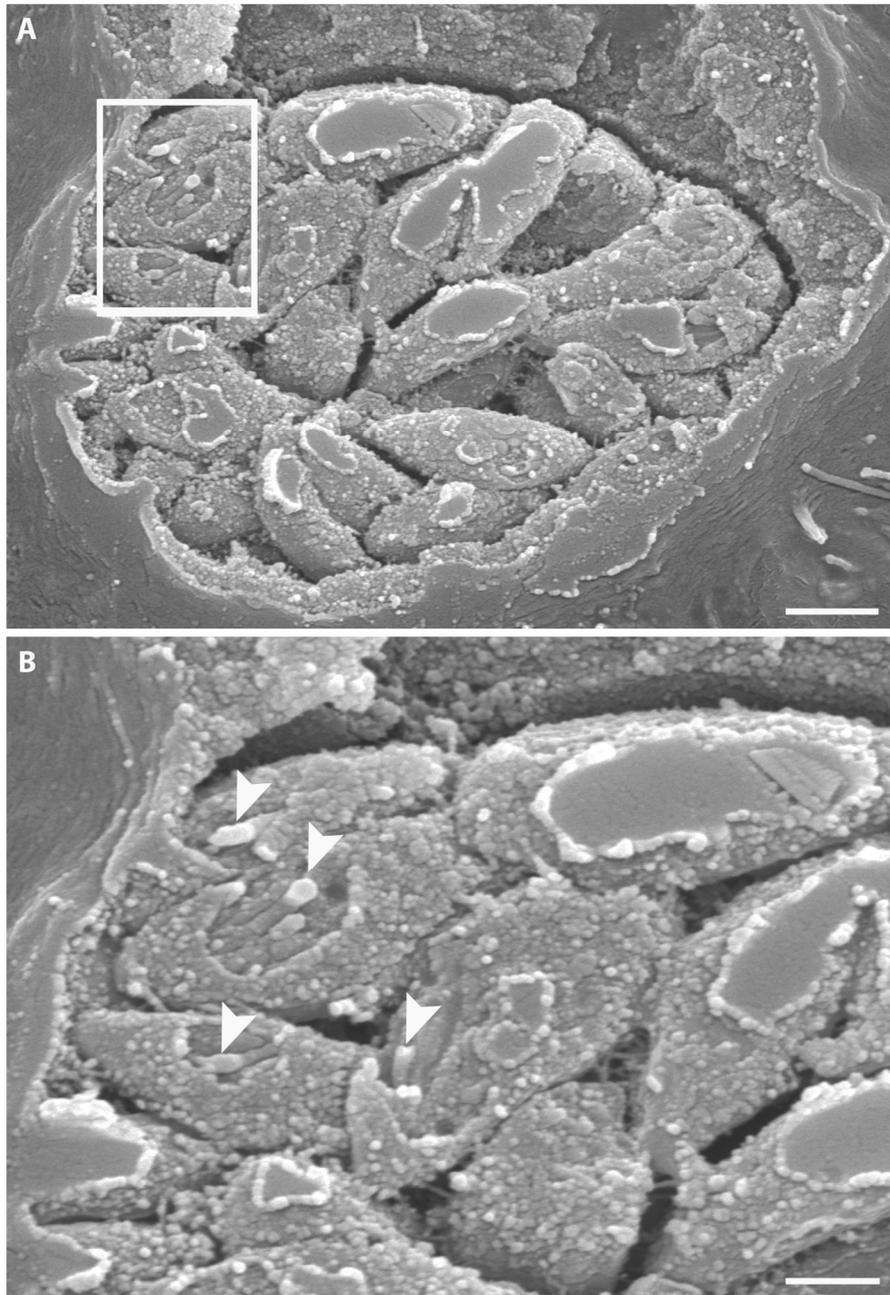
A partir de 72 h foram observadas células com VP bastante volumosos cujo formato acompanhou o volume celular fusiforme (Fig. 23A). Nesse período predominou a observação de rosetas, com a presença de corpo residual (Fig. 23B). Além disso, foi possível a identificação de formas bem organizadas, sem a presença de rosetas, com parasitos justapostos a semelhança do que é observado em formas císticas de *T. gondii* (Fig. 24A-C). A técnica da retirada de membrana permitiu a observação de róptrias no interior de alguns parasitos (Fig. 25A-B). Na mesma cultura foram observadas células com mais de um VP por célula (Fig. 26A) e parasitos em pares, indicativo de processo de replicação por endodiogenia (Fig. 26B).



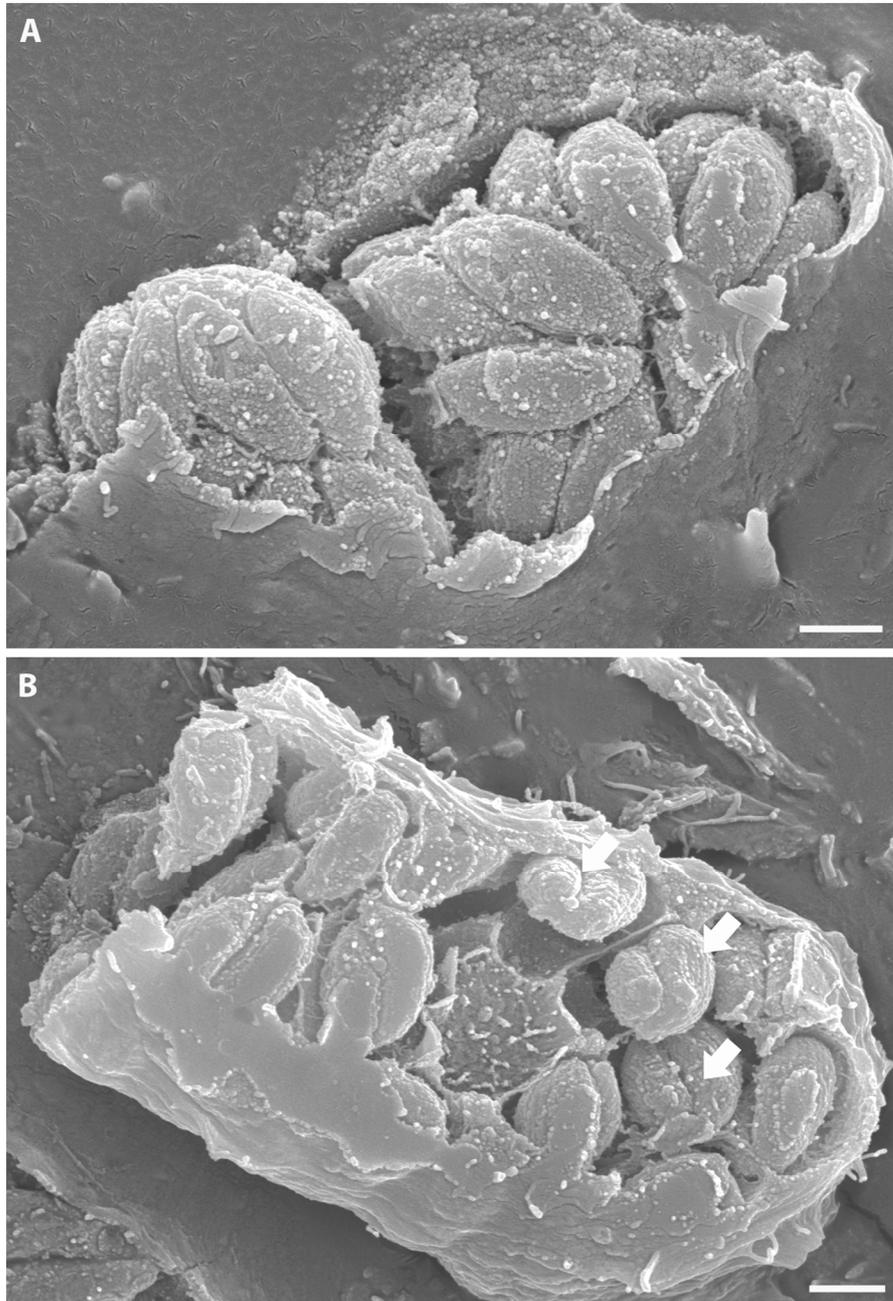
**Figura 23: Vacúolos de *T. gondii* após 72 horas de infecção.** (A) Células mostram um grande VP que acompanha o formato celular apresentando-se de forma alongada [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) Parasitos constituindo rosetas com a presença de corpo residual (CR). [Bar= 2 $\mu$ m]



**Figura 24: Formas císticas de *T. gondii* após 72 horas de infecção. (A-C)** Parasitos justapostos (setas) à semelhança do que é observado em formas císticas de *T. gondii*. [Bar= 5 $\mu$ m].

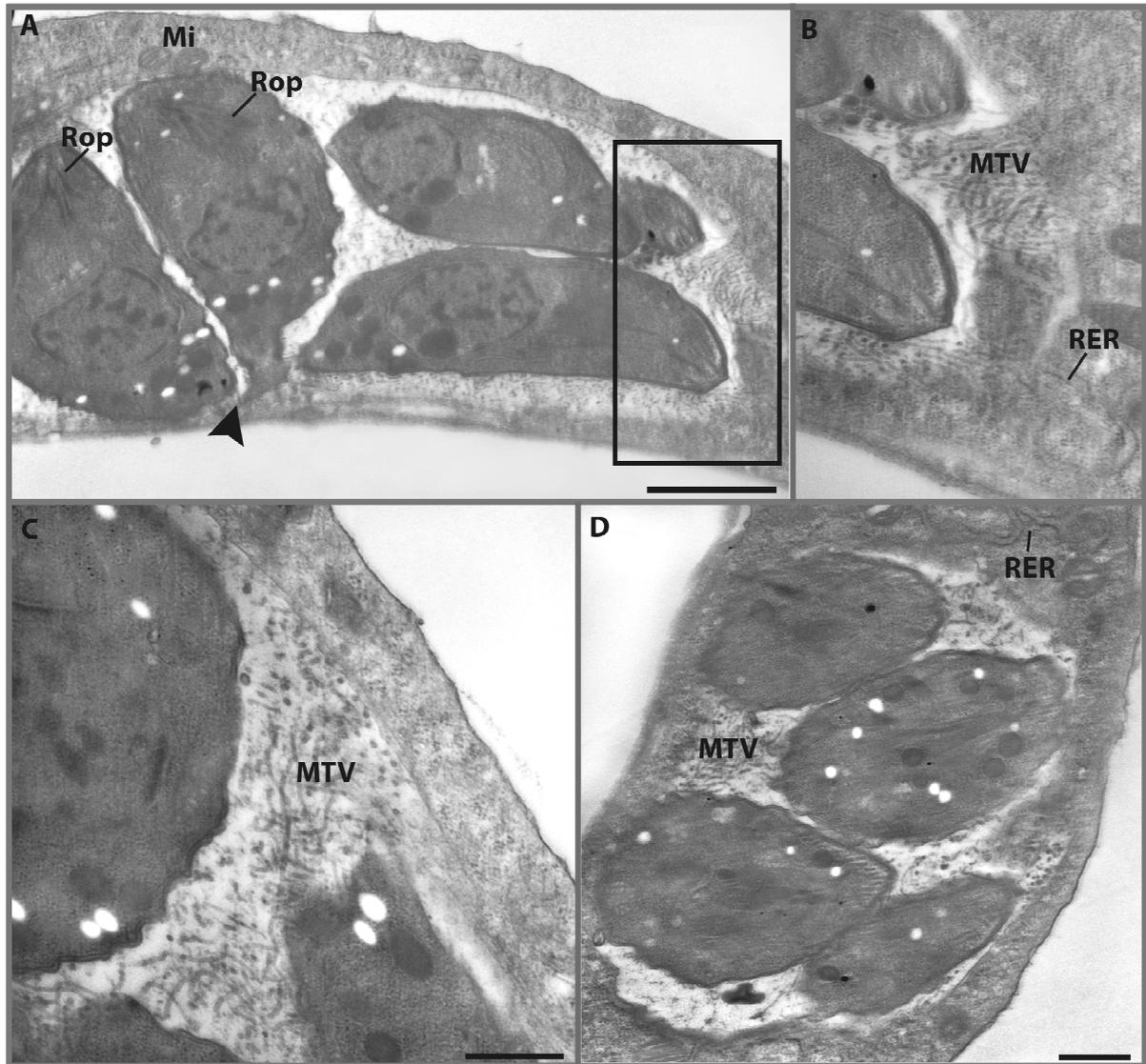


**Figura 25: Formas císticas de *T. gondii* após 72 horas de infecção.** (A) Parasitos organizados de forma justaposta. A região em destaque evidencia o interior de alguns parasitos [Bar= 2 $\mu$ m]; (B) Aumento da região observada em A, mostra róptrias dos parasitos (cabeças de setas). [Bar= 1 $\mu$ m]

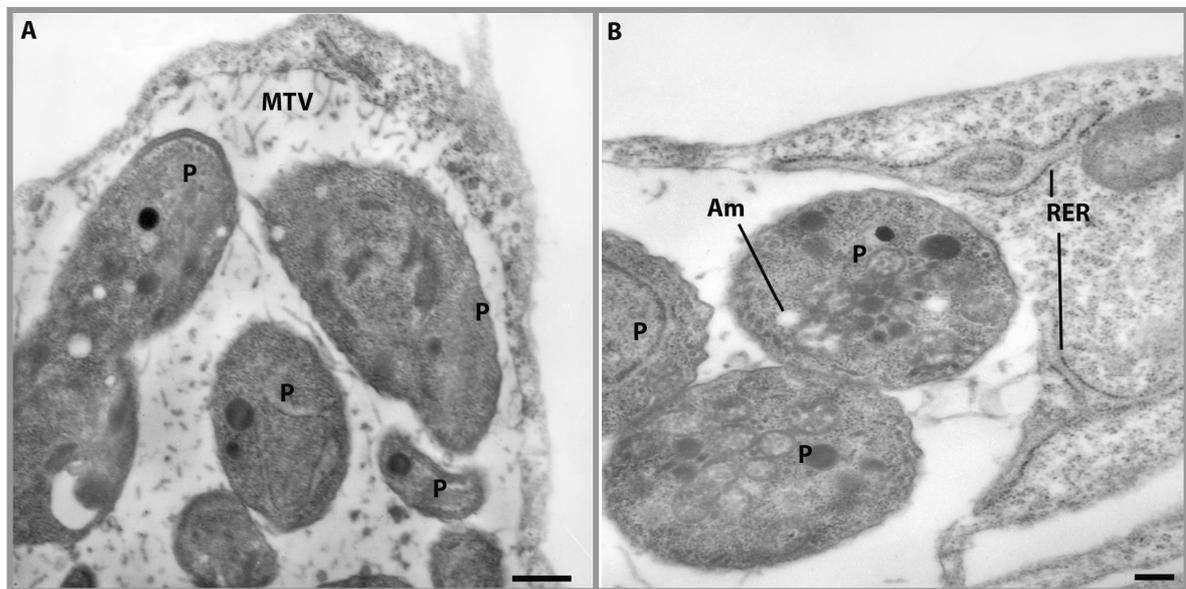


**Figura 26: Vacúolos de *T. gondii* após 72 horas de infecção.** (A) Célula mostra dois VP organizados de formas distintas entre si; (B) Parasitos em pares, indicativo de processo de replicação por endodiogenia (setas) [Bar= 2 $\mu$ m].

Em culturas CRFK, após 7 dias de infecção foi notada a presença de uma rede de membranas tubulovesiculares (MTV) expressiva (Fig. 27A-C), à semelhança do que tem sido descrito nos sistemas *in vivo* e também em enterócitos *in vitro*, como sendo uma característica do esquizonte tipo B, um dos estágios enteroepiteliais do *T. gondii*. Esses vacúolos apresentam bradizoítos em processo final de divisão celular, caracterizado pela presença do corpo residual (Fig. 27A). Poucas mitocôndrias foram observadas associadas à membrana do vacúolo parasitóforo, sendo mais freqüente a associação de RER (Fig. 27A e C). Ainda na mesma cultura, foi possível identificar em algumas células a presença de parasitos que apresentavam poucos grânulos de amilopectina, mas róptrias eletrondensas, caracterizando essas formas como bradizoítos (Fig. 27A). Eventualmente, algumas células apresentavam poucos parasitos, um ou até dois, em um mesmo VP, sugerindo reinfeção por taquizoítos que logo diferenciaram para bradizoítos ou a manutenção de formas bradizoítas intracelulares sem a observação de modificação da membrana do VP (dados não mostrados). A presença de vacúolos frouxos com MTV pouco desenvolvida ou quase ausente também foi observada após 7 dias de interação (Fig. 28A-B).



**Figura 27: Vacúolos distintos de *T. gondii* após sete dias de interação.** (A) VP contendo bradizoítos com róptrias (Rop) bem eletrondensa, em processo final de divisão celular, caracterizado pela presença do corpo residual (cabeça de seta). Os parasitos apresentam uma rede de membranas tubulovesiculares (MTV) bem desenvolvida (insert). Mitocôndrias (Mi) e RER da célula hospedeira são observadas próximo ao VP [Bar= 2 $\mu$ m]; (B) Outro VP apresentando as mesmas características da MTV [Bar= 500nm]; (C) Presença de RER associado a outro VP com presença de MTV bem desenvolvida [Bar= 1 $\mu$ m].

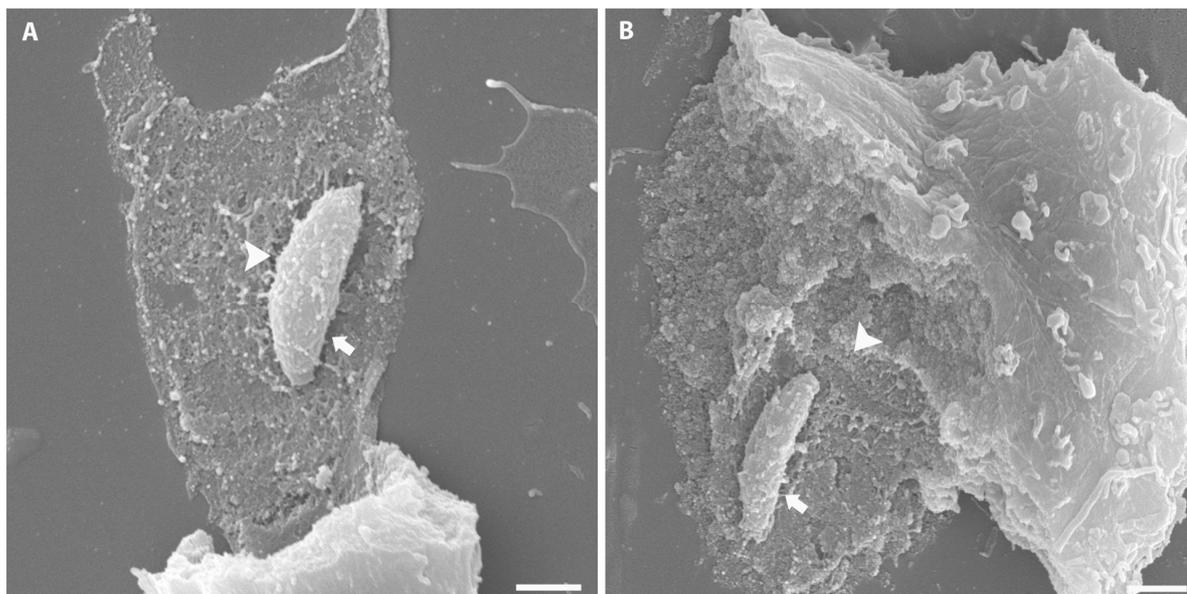


**Figura 28: Interação *T. gondii*-CRFK após 7 dias de infecção.** (A) VP mostra parasitos (P) com pouco ou nenhum grânulo de amilopectina, MTV pouco desenvolvida ou quase ausente (B) Parasitos (P) intravacuolares apresentavam poucos grânulos de amilopectina (Am) e RER da célula hospedeira bem desenvolvido e associado ao VP. [Bar= 500nm]

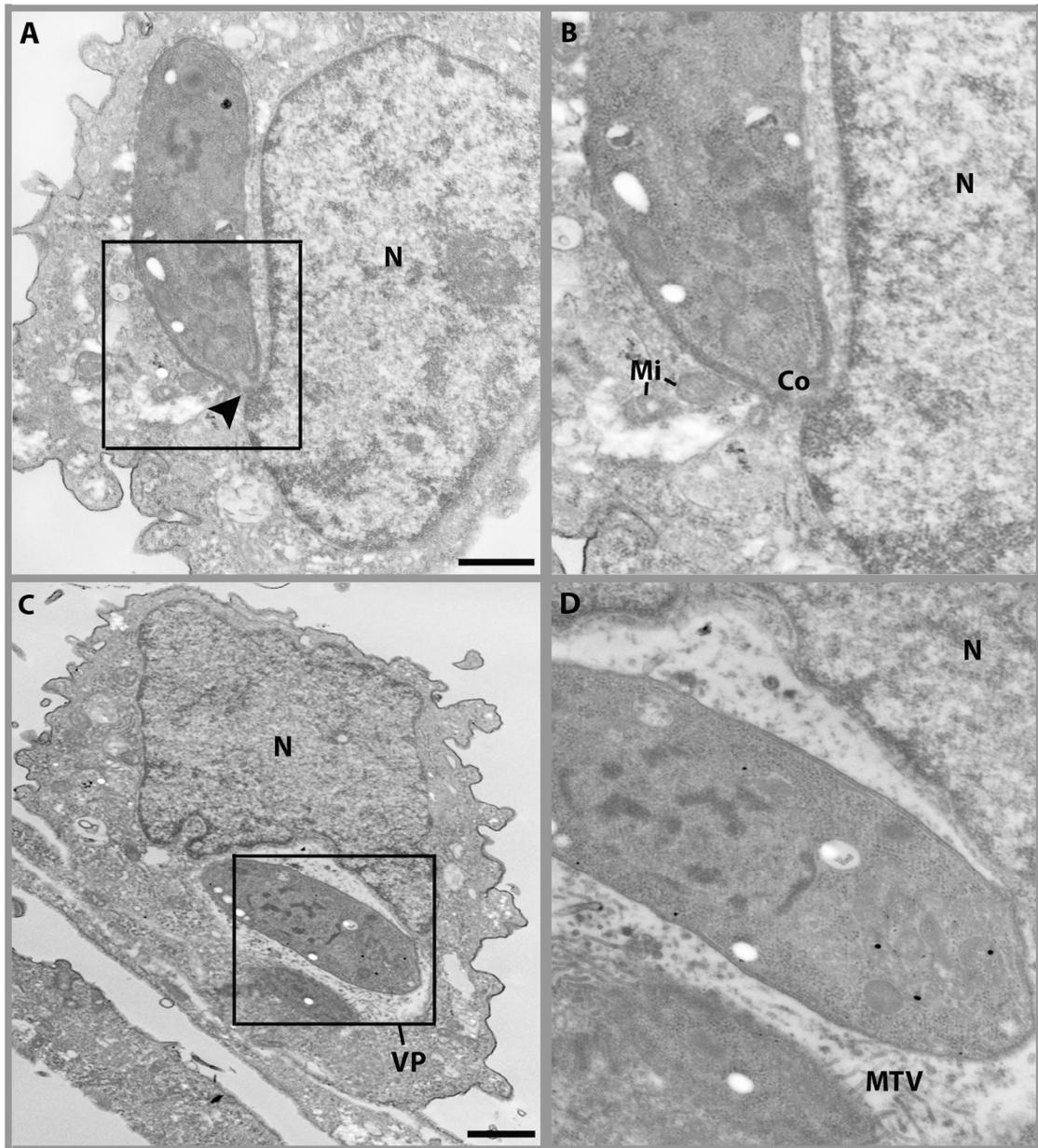
A análise por MEV após 8 dias de infecção mostrou aspectos de reinfeções recentes e de estágios mais avançados do desenvolvimento intracelular dos parasitos. A técnica de extração da membrana plasmática com a fita adesiva mostrou células contendo apenas um parasito e o arranjo de filamentos em associação com o parasito intravacuolar, possivelmente correspondente a MTV, mantendo conexão entre o parasito e a membrana interna do vacúolo parasitóforo (Fig. 29A-B). A figura 29B sugere que alguns parasitos foram destacados do vacúolo como se pode observar pela impressão do contorno do corpo nesta imagem.

Cortes ultrafinos destas culturas evidenciam vacúolos apresentando um ou dois parasitos por VP. Alguns VP apresentavam apenas um parasito intimamente ligado à membrana do vacúolo, caracterizando-o como um VP apertado (Fig. 30) circundado por mitocôndrias como pode ser observado na figura 30 B. As figuras 30A- B mostram o parasito em estreito contato através do conóide com o núcleo da célula hospedeira. Em outras células o VP foi observado com um aspecto frouxo apresentando uma rede de MTV (Fig. 30C-D).

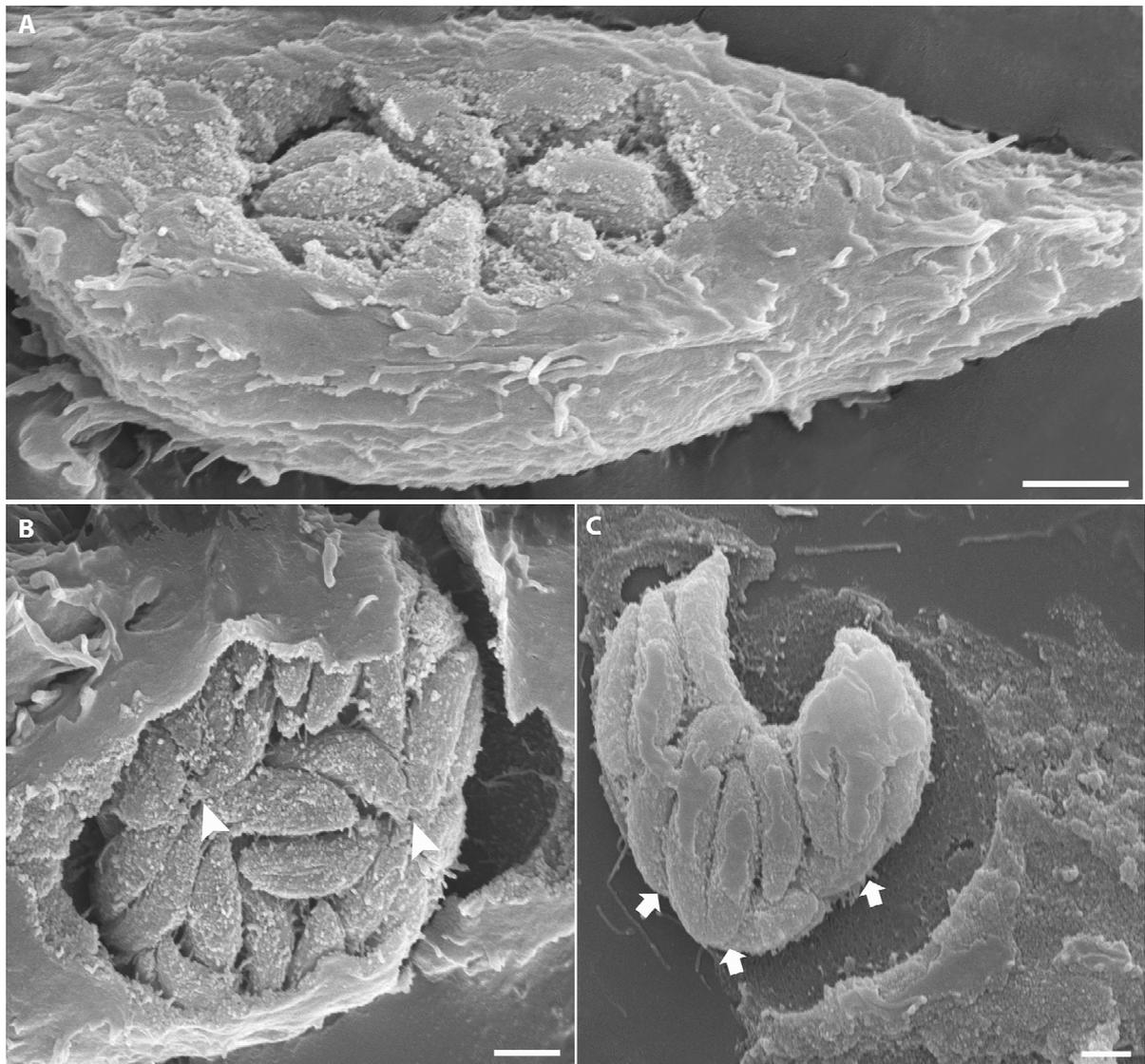
Outra característica das culturas infectadas por 8 dias, quando vistas por MEV, foi um grande número de células com vacúolos em avançado estágio de desenvolvimento. Pelo menos dois tipos de vacúolos foram detectados: (a) parasitos organizados em forma de rosetas (Fig. 31A), alguns com a presença de corpo residual (Fig. 31B) e, (b) parasitos menos organizados e justapostos, à semelhança da constituição de cistos (Fig. 31C). Algumas células estavam altamente infectadas apresentando vacúolos em estágios diferenciados de desenvolvimento contendo rosetas e outros com características típicas de cistos (Fig. 32A). Na mesma cultura, foram observadas estruturas bem organizadas sugestivas de formas císticas do parasito (Fig. 32B).



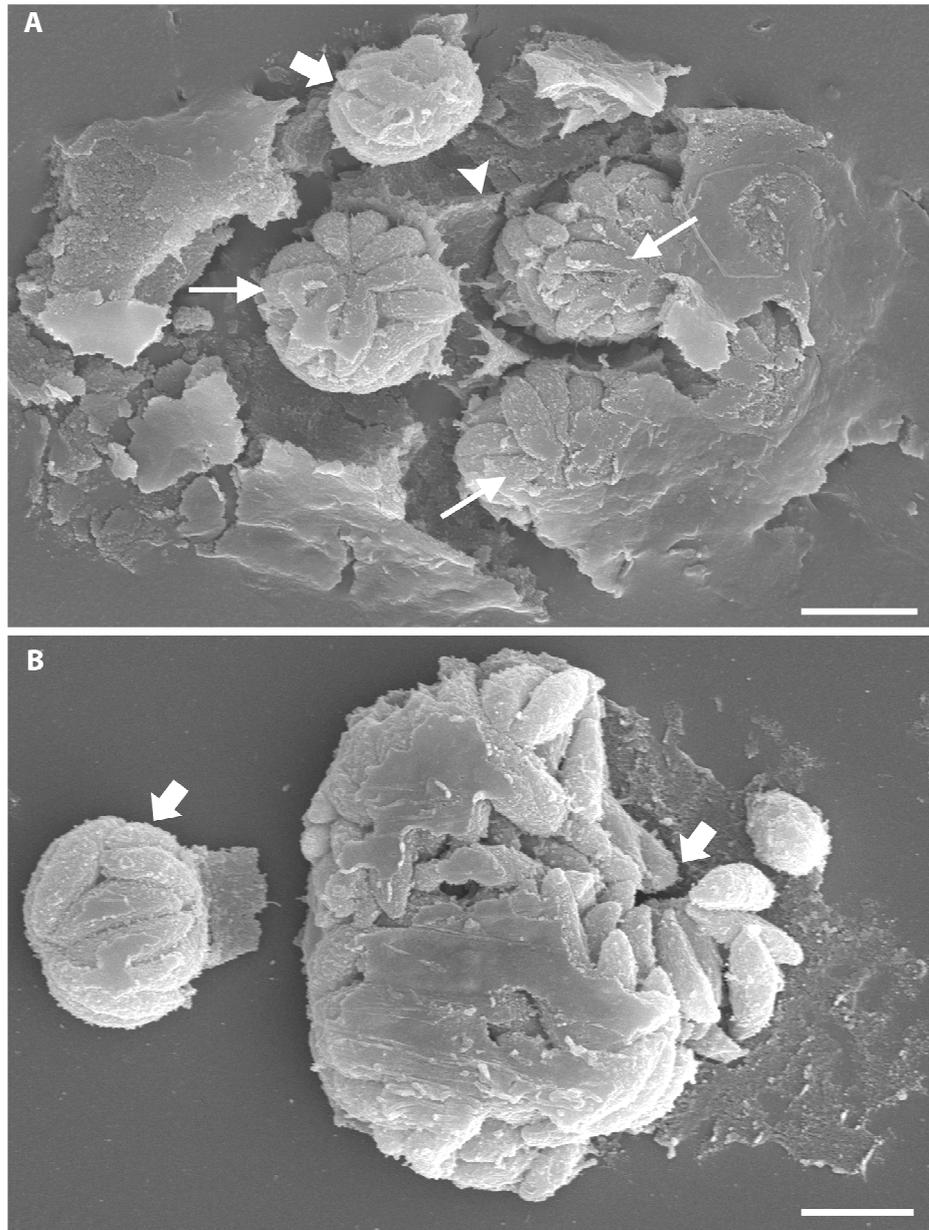
**Figura 29: Vacúolos de *T. gondii* após 8 dias de infecção.** (A) Células contendo apenas um parasito (seta) e um arranjo de filamentos em associação com o parasito intravacuolar, possivelmente correspondente a MTV (cabeça de seta); (B) Um parasito semelhante ao observado em A (seta) e a impressão do contorno do corpo (cabeça de seta) de outros parasitos que estavam compondo este VP. [Bar= 2 $\mu$ m]



**Figura 30: Reinfecção de culturas de CRFK por *T. gondii* após 8 dias de interação.** (A) Célula mostra apenas um parasito intimamente ligado ao núcleo (N) (insert cabeça de seta) [Bar= 1 $\mu$ m]; (B) Região destaca em maior aumento o contato do parasito com o núcleo (N) da célula através do conóide (Co), mitocôndrias (Mi) também são observadas próximas ao parasito; (C) Célula mostra um VP próximo ao núcleo (N) contendo dois parasitos; (D) Região mostra em maior aumento a presença de uma rede de MTV. [Bar= 2 $\mu$ m]

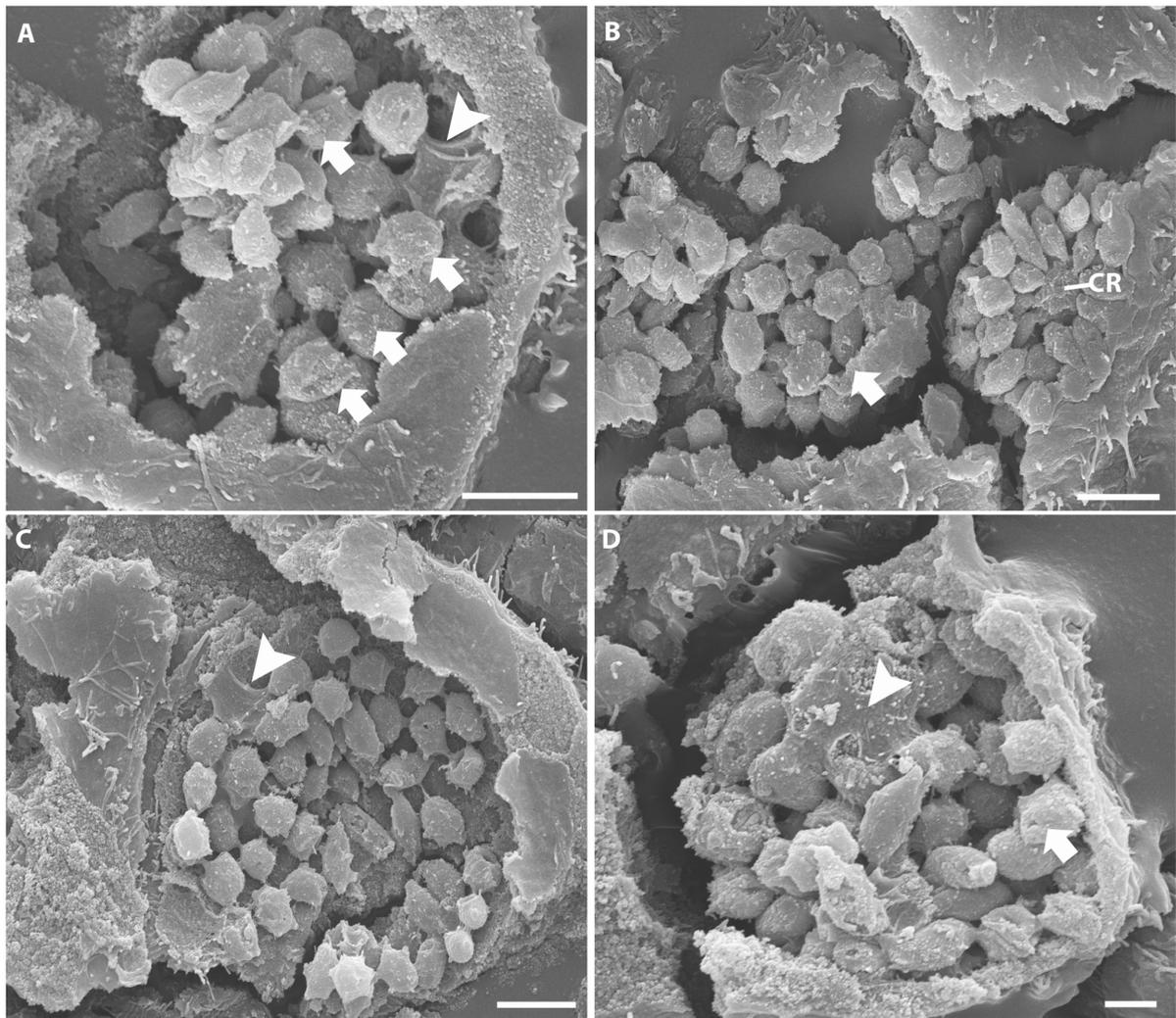


**Figura 31: Rosetas e cistos de *T. gondii* após 8 dias de interação.** (A) Parasitos organizados em forma de rosetas; (B) CRFK mostra VP com mais de uma roseta, nota-se a presença do corpo residual de cada roseta (cabeça de seta); (C) Parasitos menos organizados e justapostos (setas), à semelhança da constituição de cistos de *T. gondii*. [Bar= 2 $\mu$ m]

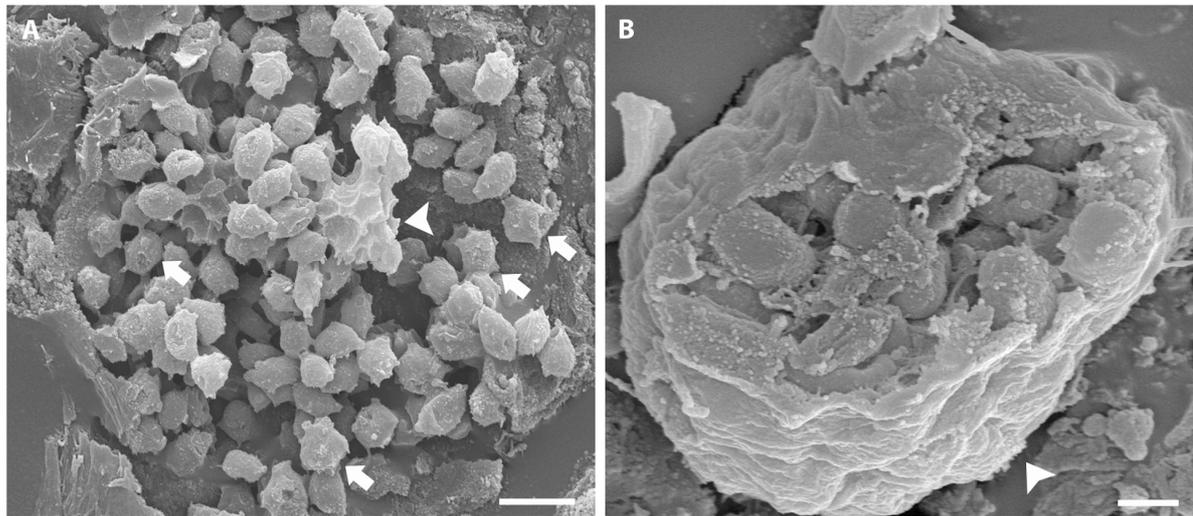


**Figura 32: Rosetas e cistos de *T. gondii* após 8 dias de interação.** (A) CRFK apresentando vacúolos com parasitos em estágios diferenciados de desenvolvimento: rosetas (seta fina) e outros com características típicas de cistos (seta grossa); Notam-se também as membranas dos VP (cabeça de seta); (B) Parasitos menos organizados e justapostos (setas), à semelhança da constituição de cistos de *T. gondii*. [Bar= 5µm]

Após 9 dias de infecção, muitas das células continham no seu interior vacúolos com parasitos desorganizados e visivelmente de tamanho menor do que o padrão, com características compatíveis com os esquizontes do tipo E, correspondentes aos estágios enteroepiteliais do *T. gondii* (Fig. 33A-D e 34A). Nessas culturas foi verificada uma grande quantidade de parasitos apresentando grupos que pareciam estar recobertos ainda por membrana do VP e/ou da própria célula (Fig. 33A-D) e outro grupo de parasitos ligados por um corpo residual bem evidente (Fig. 33B). Ainda nas mesmas culturas foram observadas estruturas contendo parasitos no interior organizados de forma semelhante a cistos, cuja estrutura envoltora apresenta características de superfície rugosa, compatível com a imagem de cistos inteiros vistos por MEV (Fig. 34B).



**Figura 33: Formas semelhantes a esquizontes de *T. gondii* após dias de infecção.** (A) Célula mostra VP com parasitos menores do que bradizoítos e taquizoítos (setas). Nota-se a presença de membrana ligando-os à parede do VP (cabeça de seta) [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) Célula mostra VP com grupos de parasitos em estágios diferenciados de desenvolvimento: menores e recobertos por membrana (seta) e outro grupo de parasitos ligados por um corpo residual (CR) bem evidente [Bar= 5 $\mu$ m]; (C) Célula mostra VP com parasitos menores apresentando contato íntimo com membranas (cabeça de seta) [Bar= 5 $\mu$ m] (D) VP mostra parasitos com morfologia diferenciada (seta) com a presença de membrana a célula hospedeira (cabeça de seta) [Bar= 2 $\mu$ m].



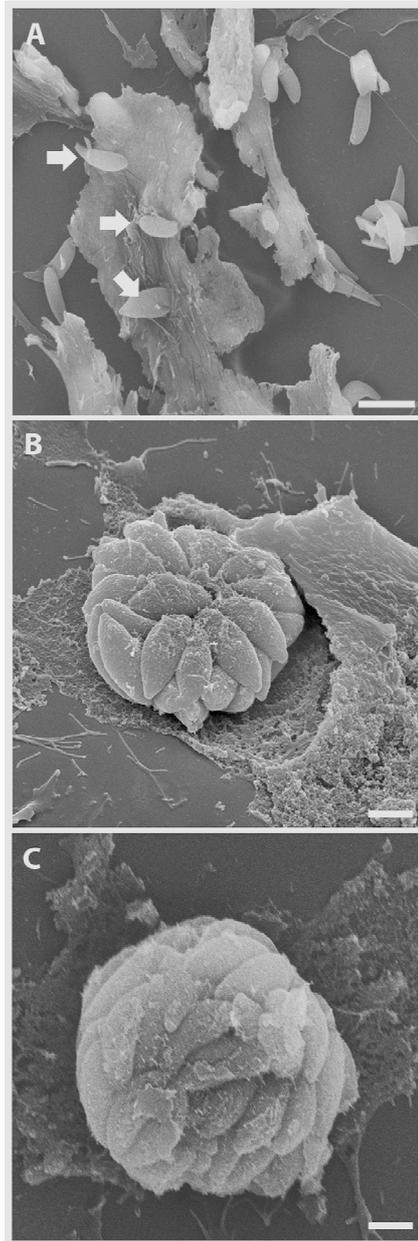
**Figura 34: Formas semelhantes a esquizontes e cistos de *T. gondii* após 9 dias de infecção.** (A) Parasitos de tamanho e aspecto distinto de bradizoítos e/ou taquizoítos (setas) apresentam membrana que conecta uns aos outros (cabeça de seta) [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) A mesma cultura apresenta estruturas contendo parasitos no interior de uma estrutura envoltora que apresenta características de superfície rugosa (cabeça de seta), compatível com a imagem da parede cística quando observada por MEV [Bar= 2 $\mu$ m].

A interação de CRFK com bradizoítos após 10 dias de infecção permitiu a observação de parasitos no meio extracelular nas etapas de adesão e invasão celular (Fig. 35A). Esses aspectos só puderam ser visualizados neste período de interação em decorrência do estabelecimento completo do ciclo lítico do parasito, que corresponde a sua invasão, replicação e egresso da célula hospedeira. Nessas culturas foram observadas simultaneamente VP com parasitos em forma de rosetas (Fig. 35B) e também, VP apresentando estruturas semelhantes à constituição de cistos (Fig. 35C).

Imagens obtidas através de cortes ultrafinos mostram células com três VP distintos que independentemente seguem rotas diferentes de diferenciação que irão determinar o destino intracelular desses parasitos (Fig. 36). O terceiro vacúolo apresentou grande diferença em relação ao aumento da espessura e da eletrondensidade da membrana, quando comparado aos dois primeiros VP, indicativo de ocorreu modificação da membrana do VP, constituindo assim a parede cística e ainda, alteração da matriz do vacúolo, características essas compatíveis com o estabelecimento da cistogênese, *in vitro* (Fig. 36 e 37).

Através da fratura da membrana da célula hospedeira e análise por MEV tivemos acesso a imagens em alta resolução que revelavam parasitos interconectados através de um sistema de túbulos bem desenvolvido que também se associava à membrana interna do VP (Fig. 38).

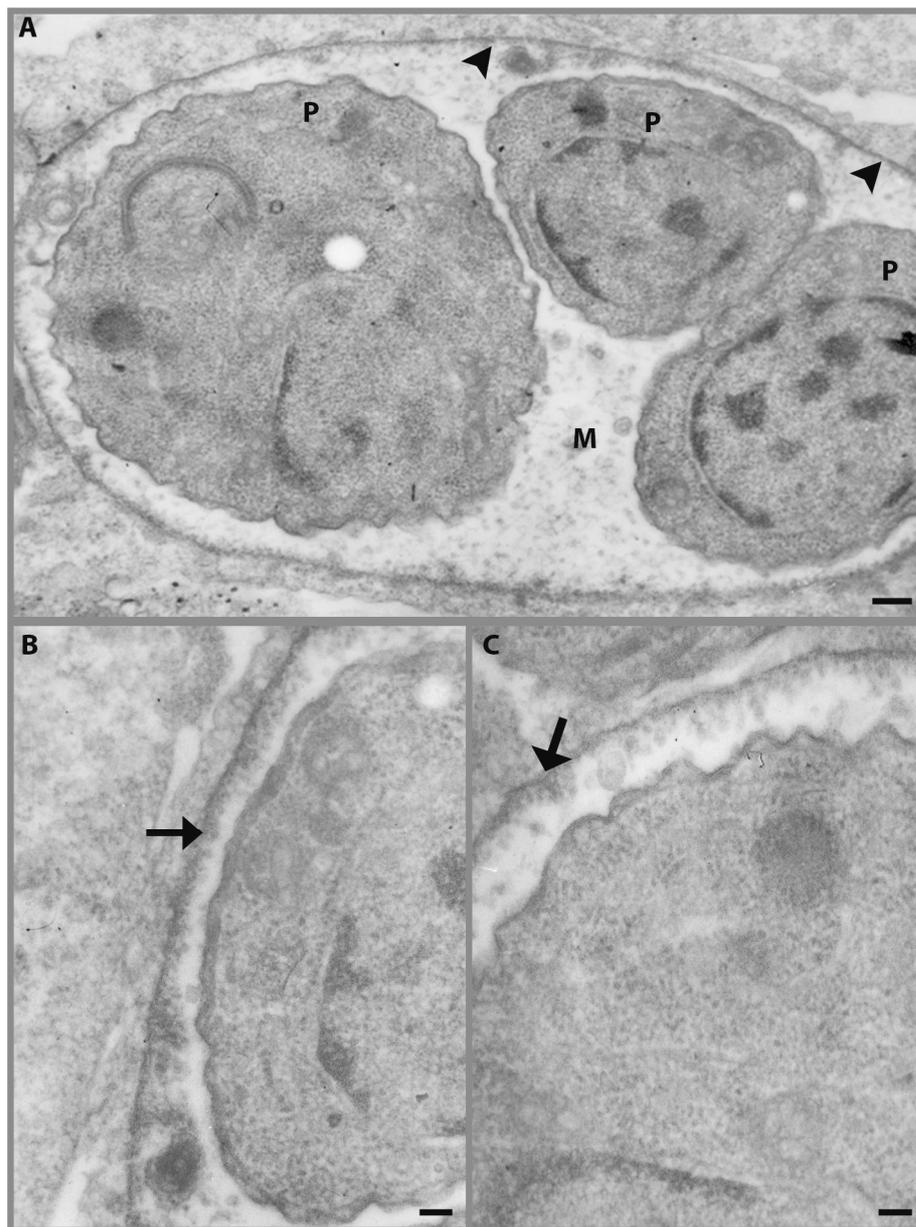
No mesmo período de interação (10 dias) foram observadas células que apresentaram um VP proeminente com diferença na eletrondensidade de membrana de acordo com a região analisada (Fig. 39). Este VP apresentou estágios infectivos morfológica e ultraestruturalmente semelhantes aos bradizoítos de *T. gondii*, principalmente pela grande quantidade de grânulos de amilopectina (Fig. 39A e 40). Este vacúolo também possuía uma estrutura arredondada de grande volume, multinucleada, com alguns grânulos de amilopectina, parasito intimamente associado à membrana do VP, corpos lipídicos e a presença de pequenas vesículas que parecem brotar de protruções peliculares desta estrutura (Fig. 41), características essas presentes nos esquizontes do tipo C, estágio enteroepitelial do *T. gondii*.



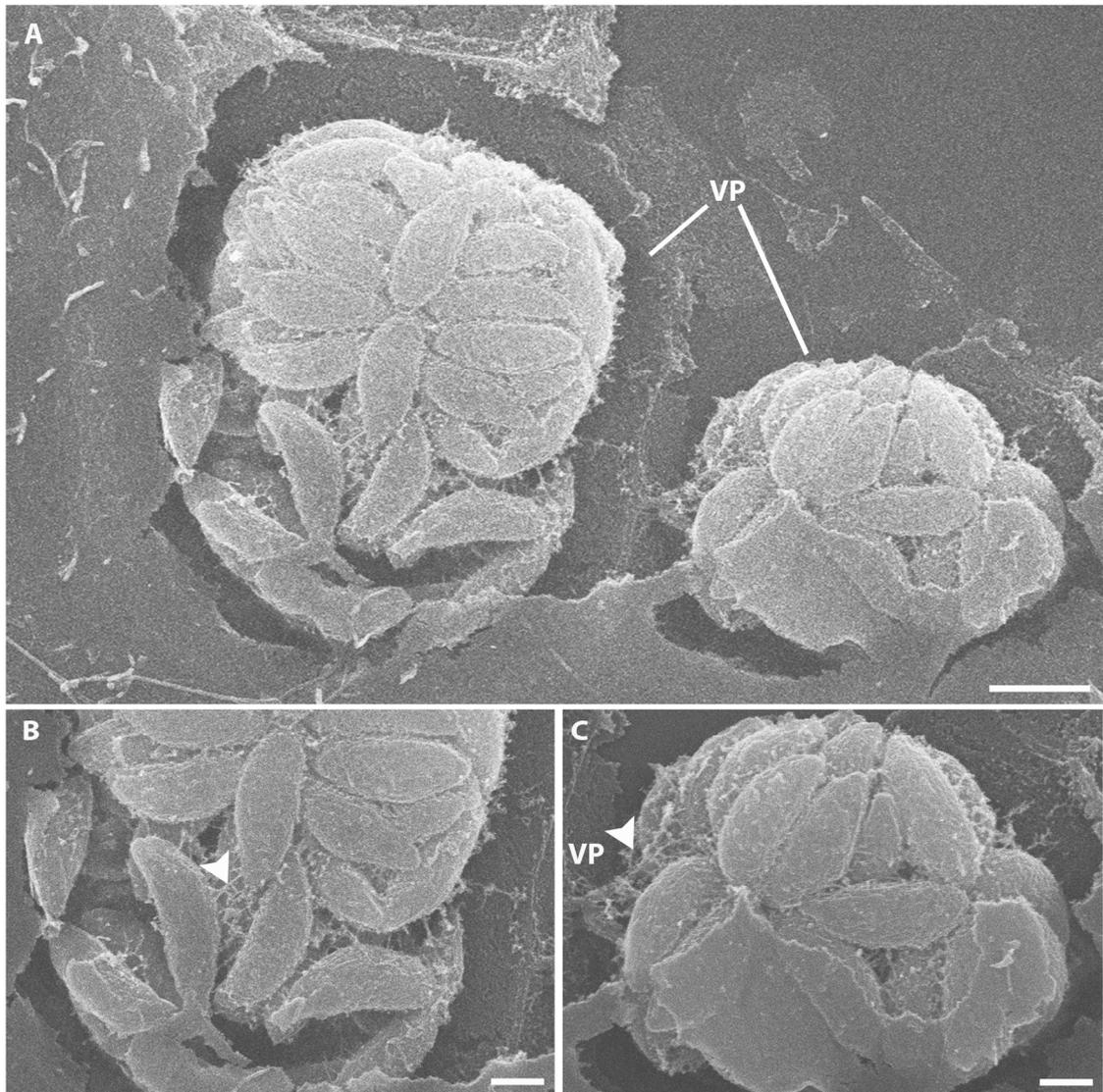
**Figura 35: Interação *T. gondii*-CRFK após 10 dias de infecção.** (A) Parasitos no meio extracelular durante os processos de adesão, invasão e egresso celular (seta) [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) VP com parasitos em forma de rosetas [Bar= 2 $\mu$ m]; (C) VP apresentando alguns parasitos bem justapostos à semelhança do que é encontrado em cistos *T. gondii* [Bar= 2 $\mu$ m].



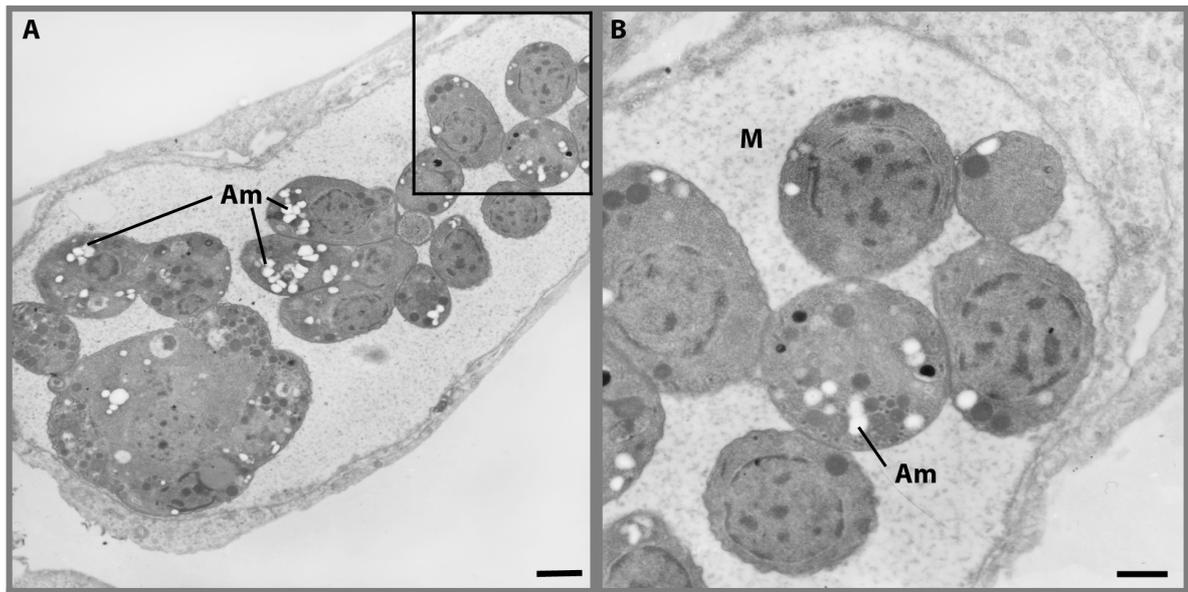
**Figura 36: Vacúolos e cistos de *T. gondii* após 10 dias de infecção.** Célula apresenta três VP distintos. O primeiro e o segundo VP mostram poucos parasitos em duplas e ausência de rede de MTV. O terceiro vacúolo apresenta grande diferença em relação ao aumento da espessura e da eletrondensidade da membrana, indicativo de formação de parede cística (cabeça de seta). [Bar= 1 $\mu$ m].



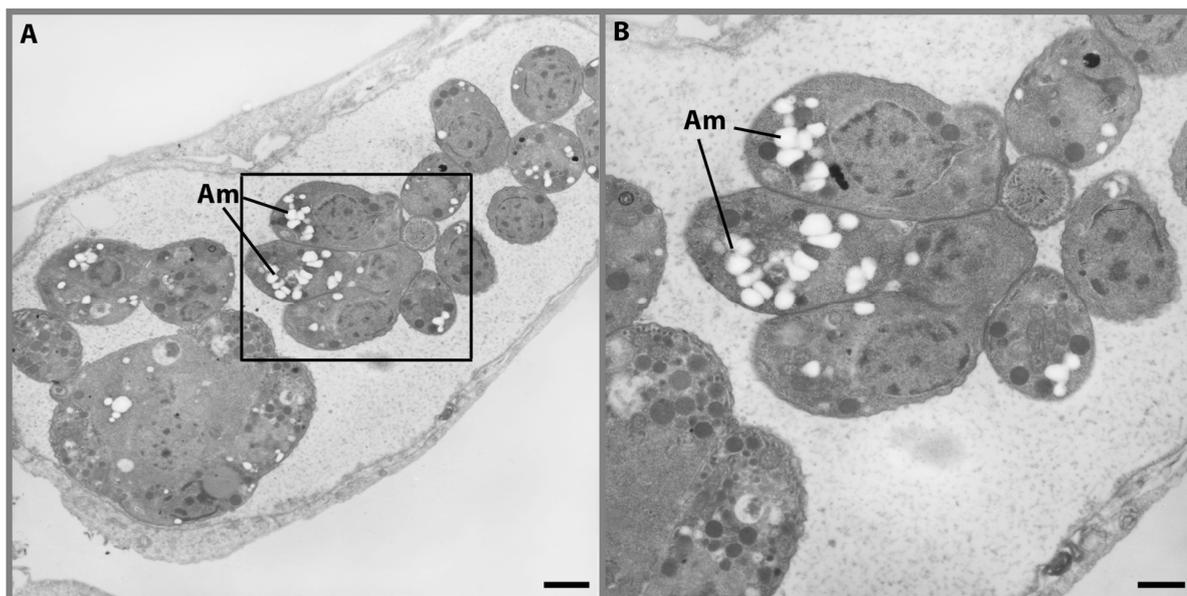
**Figura 37: Cisto de *T. gondii* após 10 dias de infecção.** (A) Terceiro VP mostrado na figura anterior, mostra detalhes do espessamento e aumento da eletrondensidade de parede (cabeça de seta). Nota-se a alteração da matriz (M) na qual se encontram os parasitos (P) [Bar= 200 nm]; (B-C) Regiões do cisto mostrado em A, em maior aumento, destacando-se a alta eletrondensidade da parede cística (seta). [Bar= 100 nm].



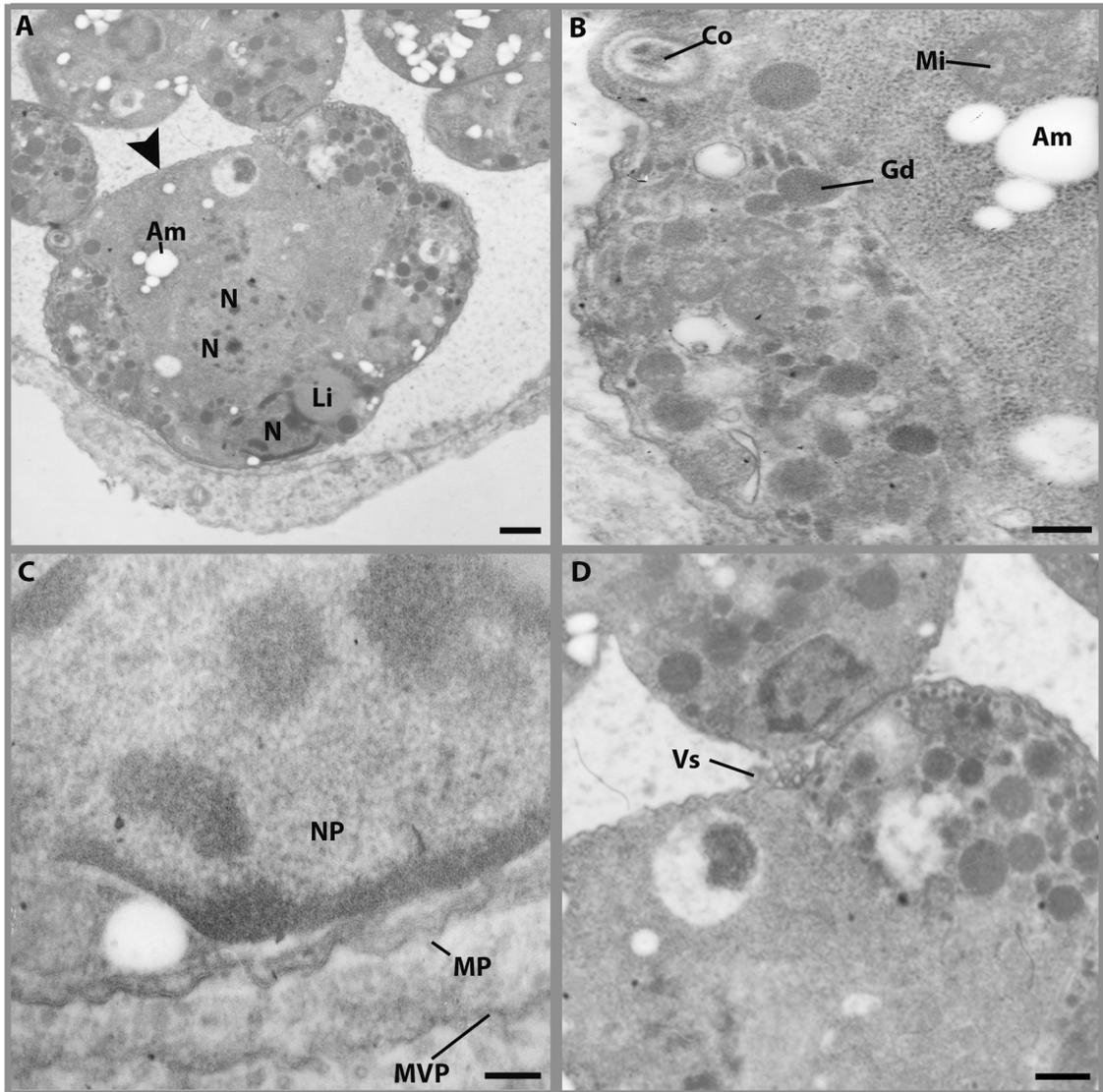
**Figura 38: Vacúolos de *T. gondii* com rede de MTV bem desenvolvida após 10 dias de interação.** (A) Células mostram dois VP com parasitos interconectados através de um sistema de túbulos bem desenvolvido [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) Detalhe da rede de MTV interconectando os parasitos (cabeça de seta); (C) Detalhe da MTV ligando o parasito à parede do VP (cabeça de seta). [Bar= 1 $\mu$ m]



**Figura 39: Aspectos ultraestruturais da interação *T. gondii*-CRFK após 10 dias de infecção.** (A) Célula mostra um VP proeminente com parasitos contendo diversos grânulos de amilopectina (Am) [Bar= 1 $\mu$ m]; (B) Aumento de região destacada em A mostra parasitos com alguns grânulos de amilopectina (Am) e presença de matriz (M) intravacuolar [Bar= 500 nm].



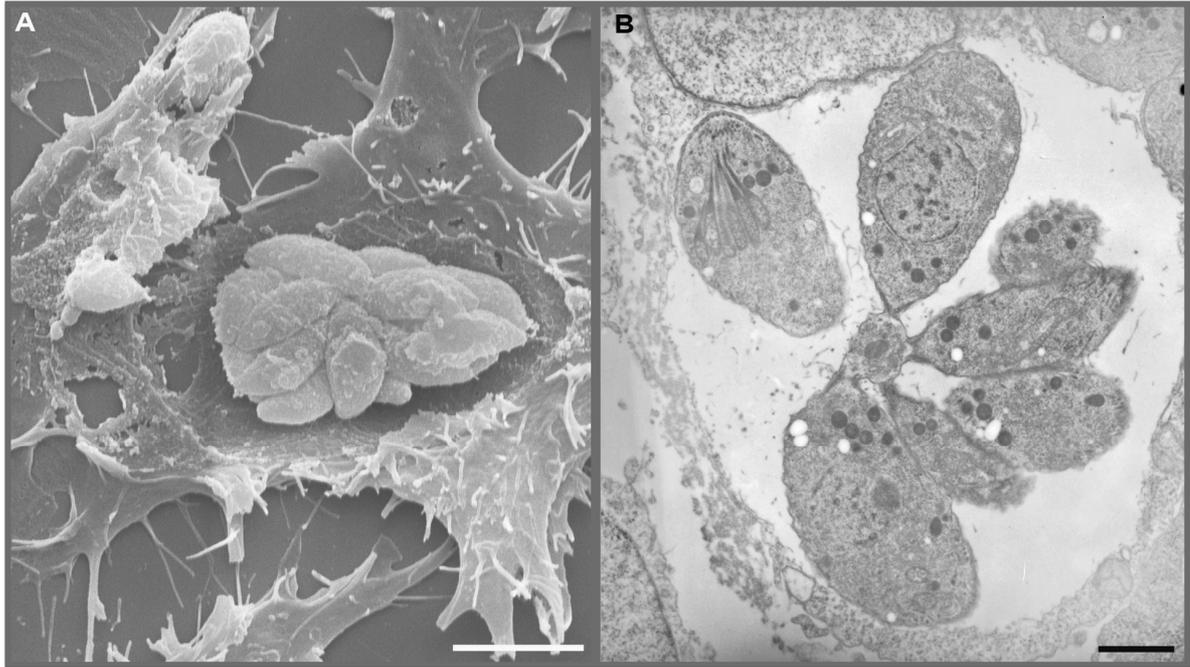
**Figura 40: Aspectos ultraestruturais da interação *T. gondii*-CRFK após 10 dias de infecção.** (A) Mesmo VP observado na Fig. 39 mostra região em destaque com estágios infectivos com grande quantidade de grânulos de amilopectina (Am) [Bar= 1 $\mu$ m]; (B) Aumento da região destacada em Evidência de diversos grânulos de amilopectina [Bar= 500 nm].



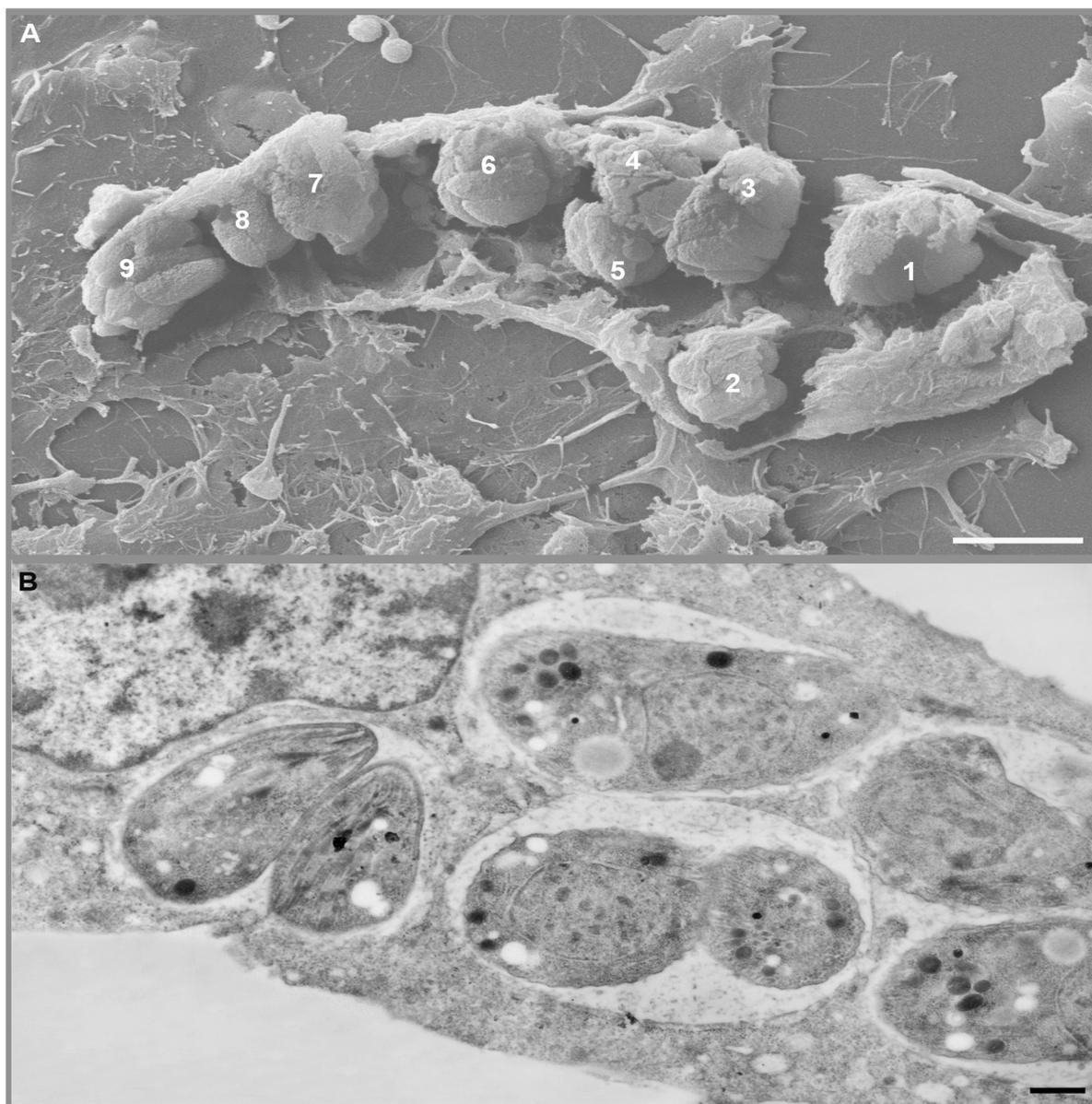
**Figura 41: Aspectos ultraestruturais da interação *T. gondii*-CRFK após 10 dias de infecção.** (A) VP mostra uma estrutura arredondada de grande volume (cabeça de seta), multinucleada (N) com grandes corpos lipídicos (Li) e presença de alguns grânulos de amilopectina (Am) [Bar= 500 nm]; (B) Detalhe do parasito observado em A mostra o conóide (Co), a presença de mitocôndria (Mi), grânulos de amilopectina (Am) e grânulos densos (Gd) [Bar= 200 nm]; (C) Detalhe da região do núcleo do parasito (NP) mostra a proximidade da membrana do parasito (MP) com a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) [Bar= 100 nm]; (D) Observa-se a presença de pequenas vesículas (Vs) que parecem brotar de protrusões peliculares desta estrutura. [Bar= 200 nm]

A partir de 13 dias de infecção foram observados VP com parasitos organizados em forma de rosetas, indicativo de replicação ativa de taquizoítos recém liberados das células hospedeiras (Fig. 42). Algumas células apresentavam dois ou mais VP numa mesma célula, como demonstrado por MEV (Fig. 43A) e por MET (Fig. 43B). Ainda na mesma cultura foram observadas estruturas de tamanhos variados, com parasitos justapostos distribuídos e organizados semelhante a cistos, mostrando que nestas células a cistogênese se estabelece de maneira espontânea (Fig. 44). Confirmando esses achados, a análise de cortes ultrafinos permitiu o acesso às estruturas intracelulares identificando e caracterizando-as como cistos, a saber: modificação da membrana e matriz do VP com aparência mais eletrondensa; parasitos repletos de grânulos de amilopectina; grande quantidade de micronemas e róprias predominantemente eletrodensas (Fig. 45 e 46). Algumas dessas células apresentavam pouco citoplasma, indícios de falência celular, provavelmente provocados pelo esgotamento de nutrientes decorrente da infecção avançada, como pode ser observado na figura 46, embora os parasitos estivessem bem preservados, indicativo de integridade celular. Esse achado sugere que essas células possam estar liberando posteriormente essas formas císticas ainda viáveis no sobrenadante da cultura celular (Fig. 46).

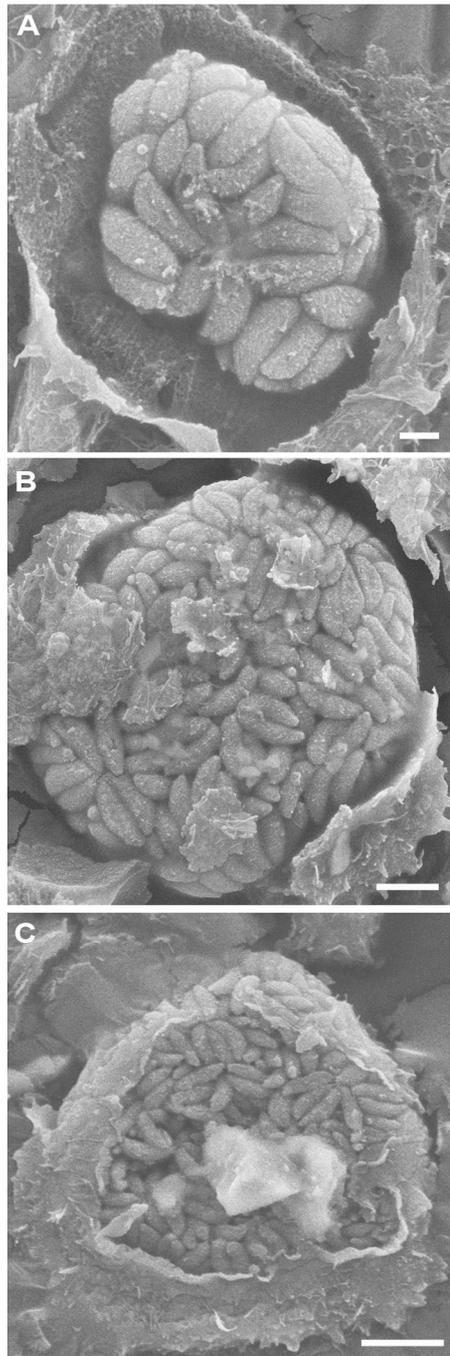
A fim de verificar a possível liberação e também a viabilidade desses cistos, após 14 dias de infecção, o sobrenadante das culturas foi processado e analisado por MET. Observou-se um cisto de *T. gondii* contendo diversos parasitos com grande quantidade de grânulos de amilopectina característicos de estágios bradizoítos. Identificou-se também acentuada eletrondensidade da parede deste cisto, que se apresentou praticamente isolado, isto é, sem sinal de estruturas da célula hospedeira associadas ao mesmo, como pode ser observado na figura 47.



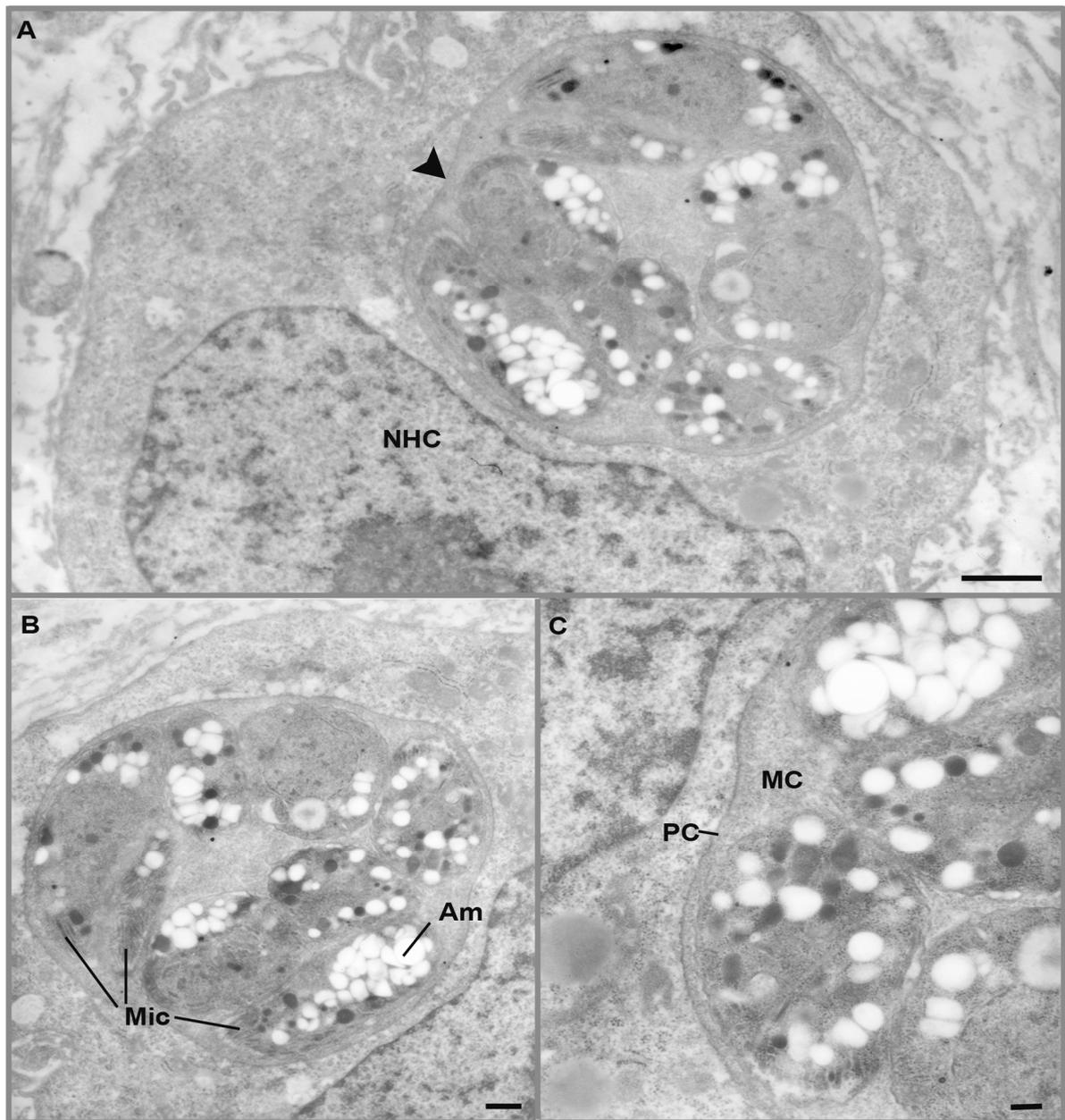
**Figura 42: Rosetas de *T. gondii*- após 13 dias de infecção. (A-B) VP com parasitos organizados em forma de rosetas. [Bar= 5µm e 1 µm, respectivamente]**



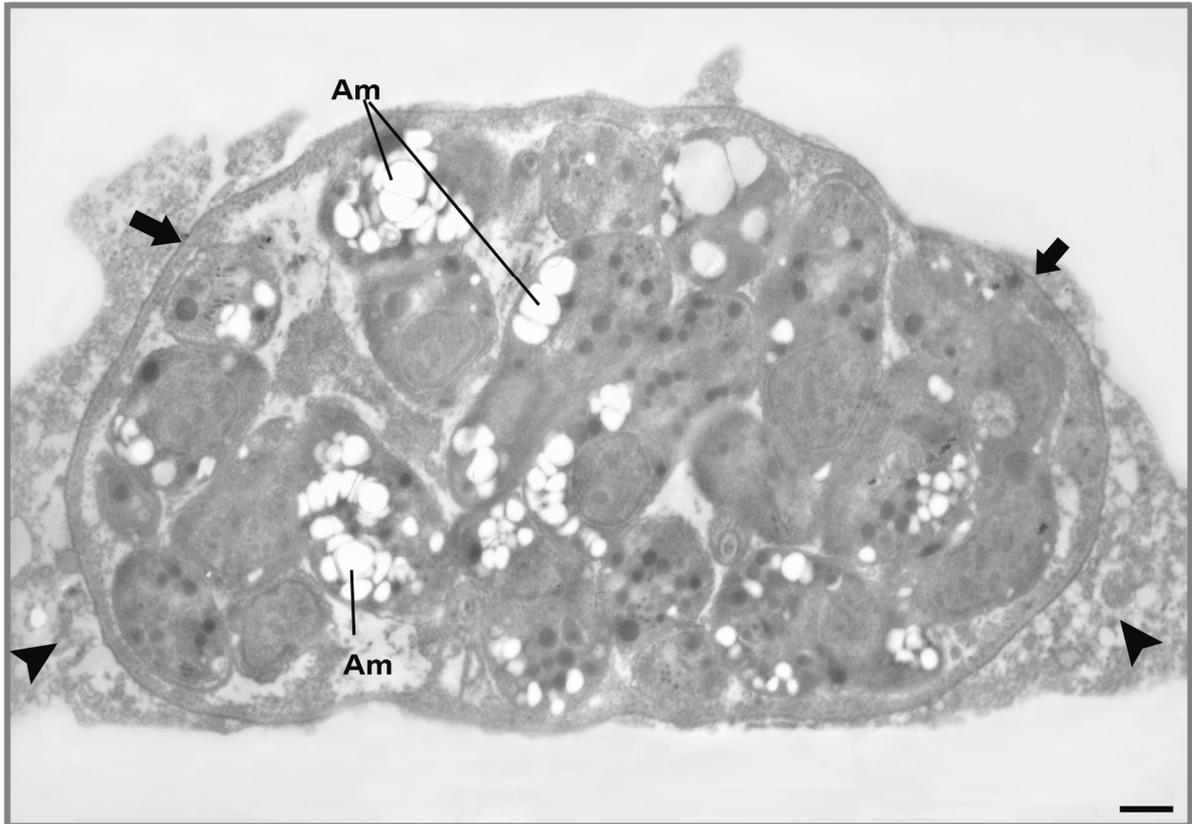
**Figura 43: Vacúolos de *T. gondii* após 13 dias de infecção.** (A) Célula apresentando cerca de nove VP ao longo de todo volume celular por MEV [Bar= 5 $\mu$ m]; (B) Outra célula apresentando o mesmo padrão de infecção observada por MET. [Bar= 1 $\mu$ m]



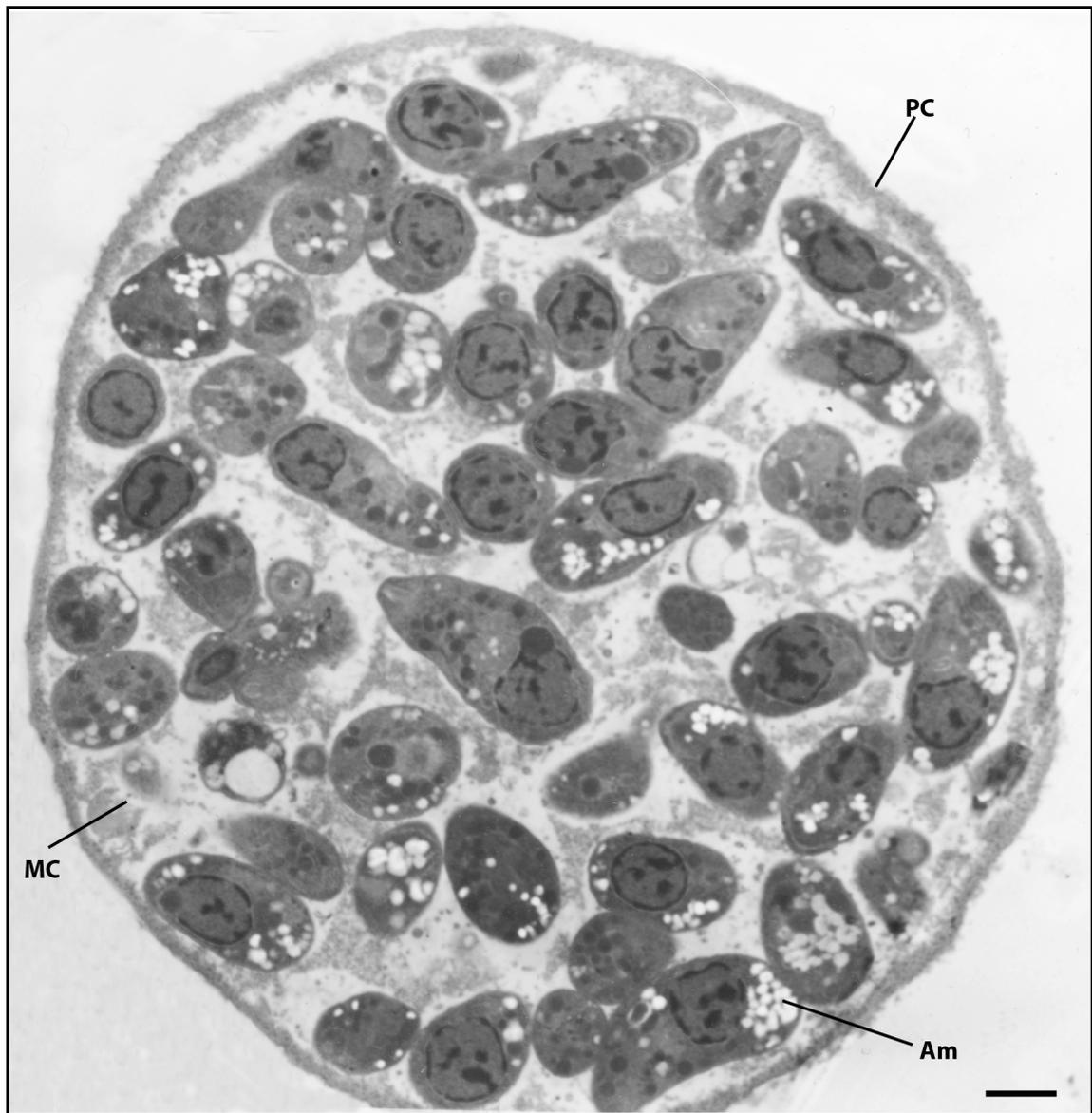
**Figura 44: Cistos de *T. gondii* após 13 dias de infecção.** (A-C) As culturas apresentaram estruturas de tamanhos variados, com parasitos justapostos distribuídos e organizados semelhante a cistos. [Bar= 2 $\mu$ m; 5 $\mu$ m e 10 $\mu$ m, respectivamente]



**Figura 45: Cistos de *T. gondii* após treze dias de infecção.** (A) Cortes ultrafinos mostram estruturas intracelulares com características de cistos (cabeça de seta) próximo ao núcleo da célula hospedeira (NHC) [Bar= 1 $\mu$ m]; (B) Parasitos repletos de grânulos de amilopectina (Am), grande quantidade de micronemas (Mic) [Bar= 500nm]; (C) Detalhe da região mostrando modificação da membrana caracterizando a parede cística (PC) e a matriz cística (MC) [Bar= 200nm].



**Figura 46: Cistos de *T. gondii* após 13 dias de infecção.** Células apresentam citoplasma escasso e com má preservação (cabeça de seta). Cisto intracelular (seta) mostra parasitos muito bem preservados com grande quantidade de grânulos de amilopectina (Am). [Bar= 1 $\mu$ m]



**Figura 47: Cisto de *T. gondii* após 14 dias de cultura.** Cisto liberado no sobrenadante de cultura após 14 dias de infecção mostra a parede cística (PC), matriz cística (MC) e diversos parasitos apresentando grande quantidade de grânulos de amilopectina (Am). [Bar= 1 $\mu$ m]

# *Discussão*

## V. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou a infectividade de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* frente a duas linhagens celulares epiteliais de origens distintas (CRFK e IEC-6). Uma das abordagens foi identificar a influência da variação da relação parasito-célula hospedeira no destino intracelular do *T. gondii* considerando-se: duas diferentes cepas do parasito e dois estágios infectivos (taquizoítos e bradizoítos). Os resultados obtidos demonstraram que a linhagem CRFK é mais susceptível à infecção do que a linhagem IEC-6, independente do estágio infectivo ou cepa do parasito. Além disso, o emprego da linhagem CRFK mostrou que o destino intracelular do parasito pode ser modulado de acordo com carga infectiva utilizada, como observado com a carga de 1:10 produzindo formas císticas e estruturas semelhantes aos esquizontes de *T. gondii*.

Um dos diferenciais deste estudo foi o emprego de formas bradizoítas durante a interação do *T. gondii*-células epiteliais, considerando-se que a grande maioria do conhecimento gerado durante os estudos envolvendo a interação *T. gondii*-célula hospedeira tem sido obtido utilizando-se estágios taquizoítos do parasito. Essa escolha se baseia provavelmente, por envolver protocolos mais simples de obtenção desses estágios (Dubey et al., 1998; Ferreira-da-Silva et al., 2008; Sibley, 2011). O emprego de bradizoítos como fonte de infecção nos estudos *in vivo* e *in vitro* são bastante restritos (Frenkel et al., 1970; Dubey e Frenkel, 1972; Dubey e Frenkel, 1973; Lindsay et al., 1991; Dubey et al., 1998; Ricard et al., 1999; Speer e Dubey, 2005; Dubey, 2006; Fouts e Boothroyd, 2007; Guimarães et al., 2008, 2009; Moura et al., 2009), pois além de envolver um grande número de animais para obtenção dos cistos contendo os bradizoítos, necessita também de um longo e delicado processo de isolamento e purificação dessas formas. A importância de se utilizar bradizoítos para estudos *in vitro* se deve ao fato de que esses estágios representam uma das principais vias de contaminação natural da doença, através da ingestão de cistos contidos em carnes cruas ou mal cozidas (Tenter, 2009). O reduzido emprego desse estágio infectivo, como modelo de estudo da toxoplasmose experimental, restringe os estudos que possam contribuir para o desenvolvimento e aplicação de novos compostos que atuem sobre a parede cística, que possibilitaria o seu acesso aos bradizoítos intracísticos interferindo assim, na fase crônica da toxoplasmose. Dessa forma, a eleição de bradizoítos como fonte de infecção no presente estudo,

abre novas perspectivas nos campos da biologia celular, molecular e quimioterapia agregando conhecimentos novos que potencialmente, ampliam as abordagens em toxoplasmose experimental.

Para a realização dessa dissertação foram utilizadas duas linhagens celulares epiteliais de origens distintas. Esses modelos celulares se justificam por ser o epitélio intestinal o nicho onde ocorre a reprodução sexuada do parasito no hospedeiro definitivo e porque a caracterização morfológica do ciclo entérico do *T. gondii* é limitada a somente cinco artigos na literatura no modelo *in vivo* (Frenkel et al. 1970; Dubey e Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005; revisto em Ferguson, 2009) e mais recentemente, um artigo *in vitro* (Moura et al., 2009). A reprodutividade destes experimentos para desenvolvimento de novas abordagens neste campo, que inclua a prática da eutanásia de gatos, é quase proibitiva, o que induz a busca de modelos alternativos. A grande maioria dos estudos *in vitro* sobre a conversão taquizoítos ↔ bradizoítos foi desenvolvida em linhagens celulares por vários motivos, dentre eles: a facilidade de crescimento destas células, sobrevivência por longos períodos como monocamadas e por ter sido proposto que o tipo celular não é determinante para a formação de cistos tissulares *in vitro* (Lindsay e cols. 1991, McHugh e cols. 1993). Porém, recentemente nosso grupo empregando células musculares esqueléticas tem sugerido fortemente que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes para a formação de cistos (Ferreira-da-Silva et al., 2008; 2009a, b). Os resultados apresentados nesta dissertação também apontaram para diferenças quantitativas e qualitativas da infecção pelo *T. gondii*, quando diferentes tipos celulares foram utilizados. As análises quantitativas demonstraram que ao utilizar taquizoítos da cepa RH do *T. gondii*, o parasito completa o ciclo lítico em 48 h nas células epiteliais de felinos (CRFK). Com relação às células epiteliais de ratos (IEC-6) houve uma redução do número de células infectadas, a partir da infecção também com taquizoítos entre 48 e 72 horas. Este resultado indica que a IEC-6 foi menos susceptível à infecção do que a CRFK, sugerindo que essa característica seja em função das propriedades intestinais da IEC-6. Outra hipótese pressupõe que a diminuição de células infectadas no curso da infecção, seja em função da ativação da via de produção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, capacitando essa célula a debelar a infecção. As características da resposta celular frente à infecção de CRFK ou IEC-6 mantiveram-se mesmo quando foram utilizadas cargas infectivas mais baixas,

sugerindo que, neste caso, o destino intracelular do parasito da cepa RH foi determinado, pelo menos em parte por fatores inerentes ao tipo celular. Outros estudos cinéticos, utilizando a cepa RH, demonstraram que linhagens de fibroblastos de gatos foram mais susceptíveis à infecção do que linhagens de fibroblastos de cães (Lei et al., 2005). Assim, os resultados obtidos na presente dissertação associados a esses estudos, reforçam a idéia de que as vias de sinalização de cada tipo celular possam estar sendo ativadas, modulando diferentemente a infecção e determinando o destino intracelular do *T. gondii*.

O emprego de formas bradizoítas como fonte de infecção para as CRFK e IEC-6 demonstrou que estatisticamente as CRFK apresentam maior susceptibilidade por bradizoítos, o que poderia ser inicialmente justificado tendo por base as características de cada tipo celular, como sugerido no parágrafo anterior.

Nossos resultados mostraram que ao serem utilizados bradizoítos, além das células de felinos serem mais susceptíveis à infecção, elas induziram, a partir de 72 horas, a cistogênese espontânea *in vitro*. Estudos preliminares, durante a quantificação da infecção de IEC-6 não apontaram na direção de que a cistogênese estivesse ocorrendo. Dessa forma, esses resultados corroboram a sugestão apontada por Dubey (2006), já que o destino intracelular do parasito foi modulado pelo estágio infectivo, os bradizoítos, e pela origem da célula-hospedeira de felinos (CRFK). Além disso, a formação dessas estruturas císticas *in vitro* foi dependente, não só da cepa do parasito e do tipo celular, mas também da carga infectiva utilizada. Estudos anteriores empregando culturas primárias de enterócitos de felinos infectadas com bradizoítos da cepa ME49 *in vitro*, revelaram a sua maior susceptibilidades à infecção quando comparadas com as linhagens IEC-6 e CRFK e também a obtenção de um maior número de formas císticas quando infectadas com uma relação parasito-célula hospedeira de 1:10 (Moura, 2008). Neste contexto, esse dado pode, além das justificativas antes discutidas, ser interpretado pelas características moleculares e fisiológicas preservadas do tecido *in vivo*, que deu origem às culturas primárias, quando comparadas às linhagens celulares.

A partir de 10 dias de infecção foram observados típicos cistos de *T. gondii*, revelados através da marcação com a lectina DBA, que se liga especificamente ao açúcar N-acetil-D-galactosamina presente na parede cística, como previamente demonstrada por Matsubayashi e Akao (1963), Weiss e Kim (2000) e Dzierszinski et al. (2004). A obtenção de altos índices de conversão e o estabelecimento da

cistogênese *in vitro* foram propostos inicialmente por Soête e cols. (1994) e Dzierszinski e cols. (2004), indicando serem dependentes de manobras experimentais, como por exemplo, aumento de temperatura ou alteração de pH. Por outro lado, alguns autores consideram que a cistogênese espontânea seja um evento dependente da cepa de *T. gondii*, tendo as cepas avirulentas, como a ME49, a capacidade natural de formar cistos em culturas celulares de mamíferos (McHugh ET al., 1993; Darde et al., 1989; Lindsay et al., 1991; Ferreira-da-Silva et al., 2009a). Essa questão ainda não foi totalmente esclarecida. Numa revisão recente, produto da experiência que nosso grupo tem acumulado nos estudos da interação do *T. gondii* com célula muscular esquelética, dados contundentes foram apresentados que sugerem ser o tipo celular um dos fatores determinantes do destino intracelular do parasito (Ferreira-da-Silva et al., 2008).

Outro aspecto importante que deve ser considerado nos resultados apresentados na presente dissertação foi a demonstração de que se diminuindo a carga parasitária para 1:10 (bradizoíto-célula hospedeira), ocorre a formação espontânea de cistos intracelulares bem definidos a partir de 10 dias de infecção, sem qualquer modulação exógena (física, química ou imunológica) das culturas. Esses dados introduzem um novo aspecto na interação do *T. gondii*-célula hospedeira: a relevância da carga infectiva neste processo sem, no entanto, descartar a hipótese de que o tipo celular esteja envolvido como um potencial indutor da cistogênese.

Os estudos de Soête e cols. (1993) infectando culturas de fibroblastos humanos com bradizoítos evidenciaram que no início da infecção 100% dos parasitos permaneciam como bradizoítos, como demonstrado através da utilização de 4 sondas específicas para bradizoítos, e com 15 horas de infecção, os parasitos expressavam antígenos de bradizoítos e taquizoítos. No nosso sistema, além do estabelecimento da cistogênese, a partir da infecção com bradizoítos, as células CFRK geraram também taquizoítos com a formação de rosetas, como revelado através da marcação dessas culturas com o anticorpo anti-p30. Alguns autores (Gross e Pohl, 1996; Sahn et al., 1997) consideram que após a infecção com formas bradizoítas da cepa ME49, alguns bradizoítos formam cistos teciduais diretamente, sem conversão transitória para taquizoítos, enquanto outros se transformam em taquizoítos antes de formar cistos (Guimarães et al., 2008). Outra possibilidade é que se mantenham como taquizoítos para a garantia da rápida

proliferação celular visando o ciclo lítico, egresso e reinfecção de novas células, como demonstrado aqui e descrito por Dubey (1997c) enfatizando que independente da forma infectiva (taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos) alguns parasitos seguem direto para a efetivação do ciclo lítico.

O estabelecimento do ciclo lítico nas culturas de CRFK foi confirmado pelas análises ultraestruturais através da microscopia eletrônica de varredura que permitiram com o auxílio de uma fita adesiva a observação de VP com parasitos em forma de rosetas e corpos residuais bem evidentes, indicativo da constante multiplicação de taquizoítos nessas culturas. Ao mesmo tempo, essas células apresentaram parasitos organizados, justapostos à semelhança do que tem sido observado em estruturas císticas, principalmente após 8 dias de infecção, corroborando os resultados apresentados pelas análises obtidas através da microscopia confocal.

As análises ultraestruturais através de cortes ultrafinos de células CRFK, infectadas com bradizoítos, a partir de 6 até 13 dias de infecção, apresentaram vacúolos parasitóforos sempre associados ao RER e mitocôndrias da célula hospedeira. Os estudos clássicos de Jones et al. (1972) descrevem que em macrófagos, somente vacúolos contendo *T. gondii* vivos eram circundados por mitocôndrias e retículo endoplasmático (revisto em Sinai et al., 1997 e em De Souza, 2005). O papel funcional dessas associações, em particular do RE parece estar vinculado ao significativo aumento da membrana do vacúolo parasitóforo durante o processo de multiplicação do parasito (de Melo e De Souza, 1997; Sinai et al., 1997; Magno et al., 2005).

Durante o período analisado, foi comum encontrar parasitos com pouco ou nenhum grânulo de amilopectina, tanto em formações de rosetas, indicativo de replicação de taquizoítos por endodiogenia, como isolados em um único VP, indicativo de re-infecção em novas células. Esses resultados, somados aos obtidos por MEV e por imunofluorescência, corroboram experimentos *in vitro* que mostraram que independente da forma infectiva utilizada (taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos), alguns parasitos inicialmente se replicam rapidamente como taquizoítos para amplificar a infecção (Dubey, 1997c). Tem sido descrito que esporozoítos recém isolados ou bradizoítos inoculados em fibroblastos *in vitro* seguem um curso definido de desenvolvimento. Essas formas evolutivas convertem para o estágio taquizoíto e depois de aproximadamente vinte divisões celulares do

início da cultura, diminuem a atividade multiplicativa antes de espontaneamente se converterem a bradizoítos (Jerome et al., 1998; Radke et al., 2003, 2005; revisto em Skariah et al., 2010).

Nas nossas culturas, alguns desses parasitos apresentavam morfologia compatível com taquizoítos, mantendo um íntimo contato com a membrana do VP e através da região do conóide com o núcleo da célula hospedeira. Essas imagens apresentavam certa analogia com a descrição da presença intranuclear de taquizoítos descrita por Barbosa et al. (2005), podendo refletir um processo pré-invasão nuclear.

Através da microscopia eletrônica de transmissão também foram observados cistos de *T. gondii* intracelulares em células CRFK confirmados pela presença de parasitos contendo grande quantidade de grânulos de amilopectina e maior eletrondensidade da membrana circundando os parasitos, semelhante à constituição da parede cística, principalmente após 10 dias de infecção. Contudo, a depender da metodologia utilizada para avaliação da cinética da cistogênese *in vitro*, diferentes resultados podem ser encontrados na literatura: variando de 6-7 dias (Shimada et al., 1974; Hoff et al., 1977), 20-21 dias (Hogan et al., 1960; Kambara et al., 1971) até 40-80 dias como descrito por Jones et al. (1986). Essas diferenças podem estar relacionadas com a virulência das cepas e com o estágio infectivo do parasito empregado. A velocidade de interconversão entre os estágios infectivos e a quantidade gerada de cistos *in vitro* têm sido relacionadas com o tipo de cepa de *T. gondii* (McHugh et al., 1993; Soête et al., 1994). As cepas de baixa virulência que são mais eficientes na formação de cistos em camundongos, tais como a ME49, têm maior velocidade de formação de cistos em cultura do que cepas de alta virulência como, a cepa RH (Soête et al., 1994), confirmado pelo emprego de células que são os principais nichos *in vivo* para a cistogênese, como o tecido muscular (Ferreira-da-Silva et al., 2008).

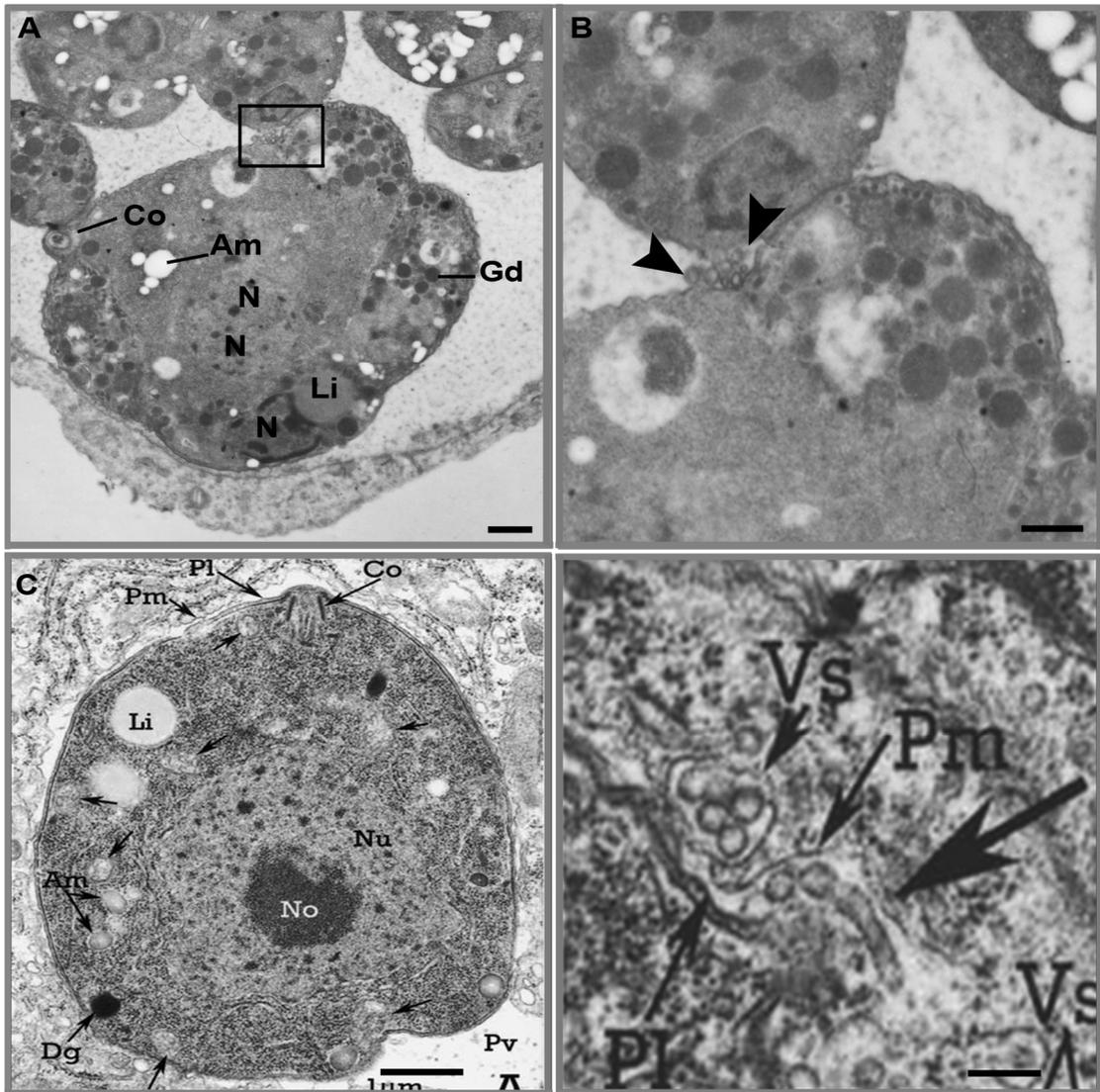
Durante o período de observação da interação parasito-célula hospedeira avaliada nesta dissertação, indícios de modificação da membrana do vacúolo parasitóforo foram evidenciados, concomitantemente com a presença de parasitos ativos em processo de divisão celular. Esses dados sugerem que embora alguns parasitos não apresentem características morfológicas de bradizoítos, eles já expressem proteínas específicas de bradizoítos e a sinalização molecular necessária para a modificação do MVP em uma nova estrutura especializada

chamada de parede cística, como demonstrada aqui e anteriormente por Bohne et al. (1993); Weiss et al. (1994, 1995); Lane et al. (1996) e Lüder et al. (1999).

Alguns desses cistos estavam presentes em células que apresentavam uma má preservação estrutural, compatível com falência celular. Ao mesmo tempo, a estrutura dos parasitos mostrava-se com ótima preservação, compatível com viabilidade celular. Esse dado sugere que essas células possam estar morrendo e liberando os cistos ainda viáveis para o sobrenadante das culturas. Dessa forma, as células CRFK apresentam potencial para produzir cistos *in vitro*, podendo contribuir para a substituição de animais experimentais como fontes para a obtenção desses cistos e de estágios bradizoítos. Recentemente, Zhang et al. (2010) desenvolveram um método de purificação de cistos de *T. gondii in vitro* utilizando a lectina DBA acoplada a esferas magnéticas sugerindo que este método se aplique aos sistemas *in vivo* e *in vitro*. Portanto, essa metodologia pode vir a ser um dos métodos de escolha para isolar cistos produzidos em culturas de CRFK.

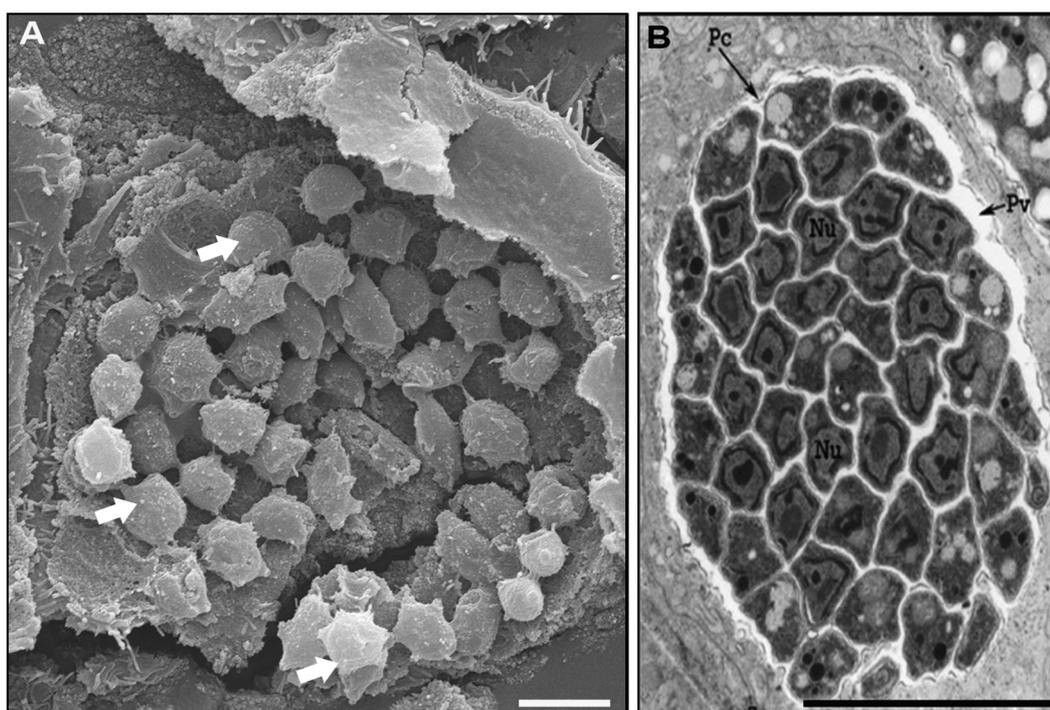
Alguns VP foram detectados contendo parasitos associados a uma rede de membranas tubulovesiculares (MTV) bastante desenvolvida ocupando praticamente toda a matriz vacuolar, descrita previamente em enterócitos por Speer e Dubey (2005) *in vivo*, durante a infecção de gatos e também observada em cultura primária de enterócitos *in vitro* (Moura, 2008). Já a partir do trabalho de Jones et al. (1972) foi observada a presença desta rede (muito menos desenvolvida) e mais tarde, os grânulos densos foram identificados como a organela responsável pela secreção das proteínas localizadas no interior do VP e associadas às redes de MTV, assim que o parasito está completamente no interior do vacúolo (Sibley et al., 1986; Cesbron-Delauw, 1994). As funções das proteínas dos grânulos densos ainda não foram totalmente elucidadas, em parte por falta de homologia significativa com proteínas de função conhecida. Apesar disso, várias evidências sugerem fortemente que as proteínas dos grânulos densos estejam envolvidas com a construção da MTV (Sibley et al., 1995). A MTV tão desenvolvida no interior de PV, em modelos *in vitro*, como a descrita aqui com uma linhagem celular epitelial de felino só teve um precedente até agora utilizando célula epitelial intestinal de felinos (Moura, 2008). Essa hipótese poderia também sugerir que esta diferenciação possa estar associada aos aspectos moleculares presentes ou mesmo ausentes, que podem ser restritos aos felinos, favorecendo assim a diferenciação dos parasitos nos seus estágios enteroepiteliais que ocorre exclusivamente nos hospedeiros definitivos.

Um fato que foi observado e que merece comentário foi a diversidade de características morfológicas dos parasitos no interior dos vacúolos parasitóforos durante a interação de bradizoítos com as células CRKF. Diferentes estágios de diferenciação puderam ser observados num mesmo vacúolo revelado pela análise ultraestrutural de culturas de CRFK infectadas com a carga de 1:10 (parasito-célula hospedeira) com formas bradizoítas. As análises revelaram características morfológicas dos parasitos intravacuolares que decididamente diferem das descritas até o momento com outros tipos celulares: parasitos imersos numa matriz vacuolar com ausência de MTV apresentando formato mais largo, com mais de um núcleo, corpos lipídicos relativamente grandes, grânulos densos e alguns grânulos de amilopectina. Essas características são compatíveis com esquizonte do tipo C, à semelhança do que foi descrito no intestino de gatos *in vivo*, 3-6 dias pós-infecção por Speer e Dubey (2005), como pode ser morfológicamente comparadas nas imagens da figura 50.



**Figura 50:** Forma esquizonte em células CRFK após 10 dias de infecção com bradizoítos de *T. gondii* versus esquizonte do tipo C descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). (A) Parasito apresentando mais de um núcleo (Nu), alguns grânulos de amilopectina (Am), corpúsculo lipídico grande (Li), grânulos densos (Dg), conóide evidenciado (Co); (B) Estágio inicial de esquizonte do tipo C descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005) apresentando núcleo (Nu), alguns grânulos de amilopectina (Am), corpúsculo lipídico grande (Li), grânulos densos (Dg) e conóide evidenciado (Co); (C) Destaque para a presença de vesículas observadas em (A); (D) Vesículas encontradas em esquizontes do tipo C descritas *in vivo*, por Speer e Dubey (2005). [Bar= 500nm]

Com o auxílio do MEV foram observados parasitos com tamanho menor do que bradizoítos e taquizoítos e também de formato distinto e bastante semelhante às características morfológicas previamente descritas para o esquizonte tipo E, identificado por Speer e Dubey (2005) como demonstrado comparativamente na Figura 51.



**Figura 51:** Formas esquizontes de *T. gondii* em células CRFK após 10 dias de infecção com bradizoítos *versus* esquizonte tipo E descrito *in vivo* por Speer e Dubey (2005). (A) Parasitos (setas largas) de tamanho e formato semelhantes aos esquizontes do tipo E, observados por MEV; (B) Esquizontes tipo E descritos *in vivo* observados por MET em Speer e Dubey (2005). [Bar= 5µm]

Além dos esquizontes dos tipos C e E foram observados com 6 dias de infecção, vacúolos contendo mais de 2 parasitos com intensa rede de membranas tubulovesicular, sugerindo o estabelecimento do esquizonte tipo B, como observado em culturas primárias de enterócitos de felinos (Moura, 2008) e *in vivo* no período de 3-6 dpi após ingestão de cistos através de gavagem por gatos (Frenkel e Dubey, 1972; Dubey e Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005; revisado em Ferguson, 2009). Essa análise morfológica comparativa nos permite inferir que as células CRFK, provenientes de felinos, possam estar induzindo o desenvolvimento

de estágios de *T. gondii* descritos previamente em enterócitos. Assim, essas células são fortes candidatas a reproduzir o ciclo os estágios do parasito que ocorre exclusivamente nos hospedeiros definitivos.

A introdução de linhagens celulares epiteliais neste estudo mostrou que potencialmente podem contribuir com novos subsídios para o melhor entendimento da biologia celular do parasito. As práticas laboratoriais, principalmente nos dias de hoje (Chatterton et al., 2010) exigem que seja adotada a prática de controle do uso de animais em laboratórios e a aplicação do princípio dos 3R: reaproveitamento, refinamento e redução de animais na pesquisa. Dessa forma, as células CRFK se mostram como um excelente modelo celular em potencial para produção de cistos *in vitro* em larga escala. Esses dados abrem perspectivas para modulações no meio de cultura, como variações do pH ou choque de temperatura visando maior indução da cistogênese nessas culturas, contribuindo assim, efetivamente para substituição gradativa da utilização de animais para obtenção de cistos e bradizoítos de *T. gondii*. Sendo assim, a linhagem celular de felinos (CRFK) se apresenta como uma metodologia alternativa para em condições controladas, investigar os aspectos moleculares desta interação que possam contribuir, por exemplo, para o desenvolvimento de novas estratégias visando à intervenção numa das principais vias de disseminação da toxoplasmose.

# *Conclusões*

## VI. CONCLUSÕES

- ✓ As células epiteliais renais de felinos (CRFK) são mais susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* do que as células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6).
- ✓ O destino intracelular do *T. gondii* foi dependente do tipo celular, da cepa do parasito, do estágio infectivo e da carga parasitária, ou ainda, da interação desses fatores determinando, por exemplo, o estabelecimento espontâneo da cistogênese em CRFK.
- ✓ Esse estudo potencialmente abre perspectivas: (i) Para a reprodução de alguns estágios enteroepiteliais de *T. gondii in vitro*, ratificando a hipótese de que este ciclo deva ser orquestrado e modulado por moléculas presentes nas células dos felinos, em função do alto grau de especificidade do parasito por esse único hospedeiro definitivo; (ii) Nos campos da biologia celular e análise molecular das vias de sinalização para o desenvolvimento do parasito; (iii) Para exploração dos aspectos moleculares desta interação que possam contribuir, por exemplo, para o desenvolvimento de novas estratégias visando a intervenção numa das principais vias de disseminação da toxoplasmose; (iv) Nos campos da inovação e desenvolvimento tecnológico para obtenção de formas infectivas do *T. gondii*, em particular cistos e bradizoítos, como alternativa para a substituição gradativa de animais experimentais.

*Referências*  
*Bibliográficas*

## VII. REFERÊNCIAS

- AHNEN, D.J., REED, T.A. and BOZDECH, J.M. 1988. Isolation and characterization of populations of mature and immature rat colonocytes. *Am J Physiol.* 254, 610-621.
- ALEXANDER, D.L., MITAL, J., WARD, G.E., BRADLEY, P. and BOOTHROYD, J.C. 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, 17.
- AJZENBERG, D., BANULS, A.L., SU, C., DUMETRE, A., DEMAR, M., CARME, B. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 34: 1185–1196.
- ALLISON, A.C. and GREGORIADIS, G. 1990. Vaccines: recent trends and progress. *Immunol Today.* 11, 427-429.
- BALLS, M. 2007. Animal experimentation and the Three Rs: the need for hard heads and soft hearts and to confront the Three "I"s. *Altern Lab Anim.* 35, 547-548.
- BADYLAK, S.F., RECORD, R., LINDBERG, K., HODDE, J. and PARK, K. 1998. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym. Ed,* 9, 863-878.
- BARBOSA, H.S., SILVA, M.F.F., GUIMARAES, E.V., CARVALHO, L., RODRIGUES, R.M., 2005. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J Parasitol.* 91:182-184.
- BARTSCH, I., ZSCHALER, I., HASELOFF, M. and STEINBERG, P., 2004. Establishment of a long-term culture system for rat colon epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40, 278-284.
- BATEN, A., SAKAMOTO, K., SHAMSUDDIN, A.M. 1992. Long-term culture of normal human colonic epithelial cells in vitro. *FASEB J.* 6:2726-34.
- BIRKNER, S., WEBER, S., DOHLE, A., SCHMAHL, G. and FOLLMANN, W. 2004. Growth and characterisation of primary bovine colon epithelial cells in vitro. *Altern Lab Anim.* 32, 555-571.
- BLACK, M.W., BOOTHROYD, J.C. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 607-623.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J. and GROSS, U. 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun.* 61, 1141-1145.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J. and GROSS, U. 1994. 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.* 62, 1761-1767.
- BOHNE, W., GROSS, U., FERGUSON, D.J., HEESEMANN, J. 1995. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol.* 16(6): 1221-1230.
- BONHOMME, A., BOUCHOT, A., PEZZELLA, N., GOMEZ, J., LE MOAL, H. and PINON, J. M. 1999. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev.* 23, 551-561.
- BOOTH, C., EVANS, G.S. and POTTEN, C.S. 1995. Growth factor regulation of proliferation in primary cultures of small intestinal epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31, 234-243.
- BOOTHROYD, J.C., GRIGG, M.E. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* 5(4): 438-442.
- BOOTHROYD, J.C., DUBREMETZ, J.F. 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 6:79-88.
- BOOTHROYD, J.C., DUBREMETZ, J.F. 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 6:79-88. Review.
- BROSSIER, F. and DAVID SIBLEY, L. 2005. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 2266-2272.
- BROSSIER, F., JEWETT, T.J., SIBLEY, L.D. and URBAN, S. 2005. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 4146-4151.
- BROWNING, K.N. and LEES, G.M. 1994. Reappraisal of the innervation of rat intestine by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y-immunoreactive neurons. *Neuroscience.* 62, 1257-1266.
- CANTIN, A. and WOODS, D.E. 1993. Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *J Clin Invest.* 91, 38-45.
- CARRUTHERS, V.B. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81, 111-122.
- CARRUTHERS, V.B., BLACKMAN, M.J. 2005. A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. *Mol Microbiol.* 55:1617-1630.

- CHARRON, A.J., SIBLEY, L.D., 2002. HOST CELLS: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 115:3049-3059.
- CHATTERTON, J.M., EVANS, R., ASHBURN, D., JOSS, A.W. and HO-YEN, D.O. 2002. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. *J Microbiol Methods.* 51, 331-335.
- CHATTERTON, J.M., MCDONAGH, S., HO-YEN, D.O. 2010. Toxoplasma tachyzoites from cell culture are more appropriate in some situations. *J Clin Pathol.* 63(5):438-40.
- CESBRON-DELAUW, M.F. 1994. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today.* 10, 293-296.
- COPPENS, I., DUNN, J.D., ROMANO, J.D., PYPAERT, M., ZHANG, H., BOOTHROYD, J.C., et al. 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* 21:261-274.
- CRANDELL, R.A., FABRICANT, C.G. and NELSON-REES, W.A. 1973. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro.* 9, 176-185.
- DARDE, M.L., BOUTEILLE, B., LEBOUTET, M.J., LOUBET, A. and PESTRE-ALEXANDRE, M. 1989. [*Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 64, 403-411.
- DE MELO, E.J. and DE SOUZA, W. 1997. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 83, 252-256.
- DE SOUZA, W. 2005. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.* 123, 1-18.
- DONAHUE, P.R., HOOVER, E.A., BELTZ, G.A., RIEDEL, N., HIRSCH, V.M., OVERBAUGH, J. and MULLINS, J.I. 1988. Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *J Virol,* 62, 722-731.
- DUBEY, J.P. 1997c. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology.* 115, 15-20.
- DUBEY, J.P. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 28, 1019-1024.
- DUBEY, J.P. 2001. Oocysts shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol.* 87: 215-219

- DUBEY, J.P. 2002. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J Parasitol.* 88, 713-717.
- DUBEY, J.P. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology.* 140 (69-75).
- DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*, p. 1-122 CRC Pres, Inc. Boca Rato. Fla.
- DUBEY, J.P. and CARPENTER, J.L. 1993. Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *J Am Vet Med Assoc.* 203, 1546-1549.
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 19: 155-177.
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. 1973. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol.* 59, 505-512.
- DUBEY, J.P. AND FRENKEL, J.K. 1998. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol.* 77, 1-32.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol. Rev* 11, 267-299.
- DUBEY, J.P., NAVARRO, I.T., SREEKUMAR, C., DAHL, E., FREIRE, R.L., KAWABATA, H.H., VIANNA, M.C., KWOK, O.C., SHEN, S.K., THULLIEZ, P., LEHMANN, T. 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol.* 90: 721-726.
- DUBEY, J.P. and WELCOME, F.L. 1988. *Toxoplasma gondii*-induced abortion in sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 193, 697-700.
- DZIERSZINSKI, F., NISHI, M., OUKO, L. and ROOS, D.S. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell.* 3, 992-1003.
- ELMORE, S.A., JONES, J.L., CONRAD, P.A., PATTON, S., LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 26:190-196.
- FERGUSON, D.J. 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol.* 34, 347-360.
- FERGUSON, D.J.P. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 104(2):133-148.

- FERREIRA DA SILVA, M.F., BARBOSA, H.S., GROSS, U., LÜDER, C. 2008a. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst.* 4:824-834.
- FERREIRA-DA-SILVA, M.F., TAKACS, A.C., BARBOSA, H.S., GROSS, U., LÜDER C.G.K., 2009a. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *International Journal of Medical Microbiology.* 299: 381-388.
- FERREIRA DA SILVA, M.F., RODRIGUES, R.M., ANDRADE, E.F., CARVALHO, L.C., GROß, U.W.E., LÜDER, C.G.K., BARBOSA, H.S. 2009b. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 140: 196-200.
- FOGH, J., FOGH, J.M. and ORFEO, T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59, 221-226.
- FOLLMANN, W., WEBER, S., BIRKNER, S. 2000. Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicol In Vitro.* 14, 435-445.
- FOUTS, A.E., BOOTHROYD, J.C. 2007. Infection with *Toxoplasma gondii* bradyzoites has a diminished impact on host transcript levels relative to tachyzoite infection. *Infect Immun.* 75(6):3209.
- FOX, B.A., GIGLEY, J.P., BZIK, D.J. 2004. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.* 34,323–331.
- FRENKEL, J.K. 1974. Breaking the transmission chain of *Toxoplasma*: a program for the prevention of human toxoplasmosis. *Bull N Y Acad Med.* 50, 228-235.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., MILLER, N.L. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* Feb 6;167(3919):893-6.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., 1972. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis.* 126, 664-673.
- FURTADO, G.C., CAO, Y., JOINER, K.A. 1992a. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun.* 60: 4925-4931.
- GADDI, P.J. and YAP, G.S., 2007. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol.* 85, 155-159.

- GOLAZ, J.L., VONLAUFEN, N., HEMPHILL, A. AND BURGNER, I.A., 2007. Establishment and characterization of a primary canine duodenal epithelial cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43, 176-185.
- GROSS, U. and POHL, F. 1996. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* **219**, 235-245.
- GROSS, U., BOHNE, W., LÜDER, C.G.K., LUGERT, R., SEEBER, F., DITTRICH, C., POHL, F., FERGUSON, D.J.P. 1996. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol.* 43: 114S-116S.
- GROSS, U. 2004. Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 47: 692-697.
- GUIMARÃES, E.V., DE CARVALHO, L.C. and BARBOSA, H.S., 2003. An alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98, 915-917.
- GUIMARÃES, E.V., CARVALHO, L.C, BARBOSA, H.S. 2008. Primary Culture of Skeletal Muscle Cells as a Model for Studies of *Toxoplasma gondii* Cystogenesis. *J. Parasitol.* 94: 72-83.
- GUIMARÃES, E.V., CARVALHO, L.C., BARBOSA, H.S., 2009. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 140, 170-174
- HAAPALA, D.K., ROBEY, W.G., OROSZLAN, S.D. and TSAI, W.P. 1985. Isolation from cats of an endogenous type C virus with a novel envelope glycoprotein. *J Virol.* 53, 827-833.
- HALONEN S.K., LYMAN, W.D., CHIU, F.C. 1996. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 1150-1156.
- HARPER, J.M., HUYNH, M.H., COPPENS, I., PARUSSINI, F., MORENO, S., CARRUTHERS, V.B. 2006. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol Biol Cell.* (10):4551-63.
- HOFF, R.L., DUBEY, J.P., BEHBEHANI, A.M., FRENKEL, J.K. 1977. *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. *J Parasitol.* 63: 1121-1124.
- HOGAN, M.J., YONEDA, C., FEENEY, L., ZWEIGART, P., LEWIS, A. 1960. Morphology and culture of *Toxoplasma*. *Arch Ophthalmol.* 64:655-667.

- HOWE, D.K., SIBLEY, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 172(6): 1561-1566.
- HOWELL, S.A., HACKETT, F., JONGCO, A.M., WITHERS-MARTINEZ, C., KIM, K., CARRUTHERS, V.B. and BLACKMAN, M.J. 2005. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. *Mol Microbiol.* 57, 1342-1356.
- HILL, D. and DUBEY, J.P. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 8, 634-640.
- JACOBS, L., REMINGTON, J.S. and MELTON, M.L. 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 46, 11-21.
- JACOBSE-GEELS, H.E. and HORZINEK, M.C. 1983. Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *J Gen Virol.* 64 (Pt 9), 1859-1866.
- JEROME, M.E., RADKE, J.R., BOHNE, W., ROOS, D.S., WHITE, M.W. 1998. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infect Immun.* 66:4838-4844.
- JOINER, K.A., FUHRMAN, S.A., MIETTINEN, H.M., KASPER, L.H., MELLMAN, I. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science.* 249:641-646.
- JONES, T.C., BIENZ, K.A., ERB, P. 1986. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect Immun.* 51: 147-156.
- JONES, T.C., YEH, S., HIRSCH, J.G. 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med.* 136, 1157-1172.
- KAMBARA, H., ENRIQUEZ, G.L., TAKAYANAGI, T. 1971. The effects of antiserum on the cyst formation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *Jpn J Parasitol.* 20: 91-94.
- KIM, K., WEISS, L.M. 2004. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol.* 34(3): 423-432.
- KAUSHIK, R.S., BEGG, A.A., WILSON, H.L., AICH, P., ABRAHAMSEN, M.S., POTTER, A., BABIUK, L.A. and GRIEBEL, P. 2008. Establishment of fetal bovine intestinal epithelial cell cultures susceptible to bovine rotavirus infection. *J Virol Methods.* 148, 182-196.

- LAINSON, R. 1958. Observation on the development and the nature of pseudo-cyst and cyst of *Toxoplasma gondii*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 52: 396-407.
- LALIBERTÉ, J., CARRUTHERS, V.B. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 65:1900-1915.
- LANE, A., SOETE, M., DUBREMETZ, J.F., SMITH, J.E. 1996. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*. *Parasitol Res.* 82: 340-346.
- LEHMANN, R., JOLLER, H., HAAGMANS, B.L. and LUTZ, H. 1992a. Tumor necrosis factor alpha levels in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus: effects of immunization and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 35, 61-69.
- LEHMANN, R., VON BEUST, B., NIEDERER, E., CONDRAU, M.A., FIERZ, W., AUBERT, A., ACKLEY, C.D., COOPER, M.D., TOMPKINS, M.B. and LUTZ, H. 1992b. Immunization-induced decrease of the CD4+:CD8+ ratio in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 35, 199-214.
- LEI, Y., DAVEY, M., ELLIS, J.T. 2005. Attachment and invasion of toxoplasma gondii and neospora caninum to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. *Parasitology.* nov;131(pt 5):583-90.
- LEIBOVITZ, A., STINSON, J.C., MCCOMBS, W.B., MCCOY, C.E., MAZUR, K.C. and MABRY, N.D. 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36, 4562-4569.
- LINDBERG, K. and BADYLAK, S.F. 2001. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns.* 27, 254-266.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. & TOIVIO-KINNUCAN, M.A. 1991. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachzoites, and sporozoites. *J. Parasitol.* 77: 126-132.
- LUDER, C.G., GIRALDO-VELASQUEZ, M., SENDTNER, M. and GROSS, U. 1999. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol.* 93, 23-32.
- MAGNO, R.C., STRAKER, L.C., DE SOUZA, W. and ATTIAS, M. 2005. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal.* 11, 166-174.

- MATSUBAYASHI, H. and AKAO, S. 1963. Morphological Studies on the Development of the Toxoplasma Cyst. *Am J Trop Med Hyg.* 12, 321-333.
- MCHUGH T.D., GBEWONYO A., JOHNSON J.D., HOLLIMAN R.E., BUTCHER P.D., 1993. Development of an in vitro model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Lett.* 114:325-332.
- MEHLHORN, H. and FRENKEL, J. K. 1980. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol.* 66, 59-67.
- MERCIER, C., DUBREMETZ, J.F., RAUSCHER, B., LECORDIER, L., SIBLEY, L.D. and CESBRON-DELAUW, M.F. 2002. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell.* 13, 2397-2409.
- MIYAZAWA, T., TOYOSAKI, T., TOMONAGA, K., NORIMINE, J., OHNO, K., HASEGAWA, A., KAI, C. and MIKAMI, T. 1992. Further characterization of a feline T-lymphoblastoid cell line (MYA-1 cells) highly sensitive for feline immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci.* 54, 173-175.
- MONTOYA, J. G. and LIESENFELD, O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363, 1965-1976.
- MORDUE, D. G., DESAI, N., DUSTIN, M. and SIBLEY, L. D. 1999. 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.* 190, 1783-1792.
- MOURA M.A., AMENDOEIRA, M.R., BARBOSA, H.S. 2009. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 862-864
- NELSON-REES, W. A., WEAVER, J. and RIGGS, J. L. 1972. Chromosomes of two strains of a feline cell line (F 1 B) permanently shedding a C-type virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 139, 6-9.
- OPITZ, C. and SOLDATI, D. 2002. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 45, 597-604.
- PACHECO-SOARES C, DE SOUZA W. 1998. Redistribution of parasite and host cell membrane components during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Struct Funct.* 23:159-68.
- PARASKEVA, C., BUCKLE, B.G., SHEER, D. and WIGLEY, C.B. 1984. The isolation and characterization of colorectal epithelial cell lines at different stages in

- malignant transformation from familial polyposis coli patients. *Int J Cancer*. 34, 49-56.
- PEDERSEN, B.L., BRONSTED, H., LENNERNAS, H., CHRISTENSEN, F.N., MULLERTZ, A. and KRISTENSEN, H.G. 2000. Dissolution of hydrocortisone in human and simulated intestinal fluids. *Pharm Res*. 17, 183-189.
- POTTEN, C.S. and GRANT, H.K. 1998. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer*. 78, 993-1003.
- QUARONI, A. 1986. Fetal characteristics of small intestinal crypt cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 1723-1727.
- QUARONI, A., WANDS, J., TRELSTAD, R.L. and ISSELBACHER, K.J. 1979. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol*. 80, 248-265.
- QUARONI, A., TIAN, J.Q., GOKE, M. and PODOLSKY, D.K. 1999. Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol*. 277, G1027-1040.
- RADKE, J.R., GUERINI, M.N., JEROME, M., WHITE, M.W. 2003. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoites differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 131:119–127.
- RADKE, J.R., BEHNKE, M.S., MACKEY, A.J., RADKE, J.B., ROOS, D.S., WHITE, M.W. 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol*. 3:26.
- RICARD, J., PELLOUX, H., GROSS, U., MEUNIER, A., AMBROISE-THOMAS, P. 1999. Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor. *J Parasitol*. 85(3):583-5.
- RUSU, D., LORET, S., PEULEN, O., MAINIL, J., DANDRIFOSSE, G., 2005. Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures. *BMC Cell Biol*. 6, 42.
- SAEIJ, J.P., BOYLE, J.P., BOOTHROYD, J.C. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. 21(10): 476-481.
- SAHM, M., FISCHER, H.G., GROSS, U., REITER-OWONA, I., SEITZ, H.M. 1997. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* in vivo and in brain-cell culture: a comparative morphology and immunocytochemistry study. *Parasitol Res*. 83: 659-665.
- SASONO, P.M. and SMITH, J.E. 1998. *Toxoplasma gondii*: an ultrastructural study of host-cell invasion by the bradyzoite stage. *Parasitol Res*. 84, 640-645.

- SCHORKHUBER, M., KARNER-HANUSCH, J., SEDIVY, R., ELLINGER, A., ARMBRUSTER, C., SCHULTE-HERMANN, R. and MARIAN, B. 1998. Survival of normal colonic epithelial cells from both rats and humans is prolonged by coculture with rat embryo colonic fibroblasts. *Cell Biol Toxicol.* 14, 211-223.
- SHIMADA, K., O'CONNOR, G.R., YONEDA, C. 1974. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* (RH strain) in vitro. The role of immunologic mechanisms. *Arch Ophthalmol.* 92: 496-500.
- SIBLEY, L.D., KRAHENBUHL, J.L., ADAMS, G.M. and WEIDNER, E. 1986. Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol.* 103, 867-874.
- SIBLEY LD, NIESMAN IR, PARMLEY SF, CESBRON-DELAUW MF. 1995. 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.* 108:1669 -1677
- SIBLEY, L.D., HAKANSSON, S., CARRUTHERS, V.B. 1998. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol.* 8:R12-14.
- SIBLEY, L.D. 2003. Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. *Traffic.* 4, 581-586.
- SIBLEY, L.D. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev.* 240(1):72-91.
- SINAI, A.P. 2008. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem.* 47:155-164
- SINAI, A.P., WEBSTER, P. and JOINER, K.A. 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 17), 2117-2128.
- SKARIAH, S., MCINTYRE, M.K., MORDUE, D.G. 2010. Toxoplasma gondii: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res.* 107(2):253-60.
- SOETE, M., FORTIER, B., CAMUS, D., DUBREMETZ, J.F. 1993. *Toxoplasma gondii* : kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro, *Exp Parasitol.* 76:259-264.
- SOETE, M., CAMUS, D., DUBREMETZ, J.F. 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro, *Exp Parasitol.* 78:361-370.
- SPEER, C.A., CLARK, S. and DUBEY, J.P. 1998. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 84, 505-512.

- SPEER, C.A., DUBEY, J.P. 2005. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.* 35, 193-206.
- STAUFFER, J.S., MANZANO, L.A., BALCH, G.C., MERRIMAN, R.L., TANZER, L.R. and MOYER, M.P. 1995. Development and characterization of normal colonic epithelial cell lines derived from normal mucosa of patients with colon cancer. *Am J Surg.* 169, 190-195; discussion 195-196.
- STRATER, J., WEDDING, U., BARTH, T.F., KORETZ, K., ELSING, C. and MOLLER, P. 1996. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology.* 110, 1776-1784.
- TABUCHI, Y., OHTA, S., ARAI, Y., KAWAHARA, M., ISHIBASHI, K., SUGIYAMA, N., HORIUCHI, T., FURUSAWA, M., OBINATA, M., FUSE, H., TAKEGUCHI, N. and ASANO, S. 2000. Establishment and characterization of a colonic epithelial cell line MCE301 from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Struct Funct.* 25, 297-307.
- TEMES, R.T., KAUTEN, R.J. and SCHWARTZ, M.Z. 1991. Nuclear magnetic resonance as a noninvasive method of diagnosing intestinal ischemia: technique and preliminary results. *J Pediatr Surg.* 26, 775-779.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: From Animals to Humans. *Int J Parasitol.* 30:1217-1258.
- TENTER, A.M. 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 364-369.
- TRABER, P.G., GUMUCIO, D.L. and WANG, W. 1991. Isolation of intestinal epithelial cells for the study of differential gene expression along the crypt-villus axis. *Am J Physiol.* 260, G895-903.
- VAN MOUWERIK, T.J., PANGALLO, C.A., WILLSON, J.K. and FISCHER, P.H. 1987. Augmentation of methotrexate cytotoxicity in human colon cancer cells achieved through inhibition of thymidine salvage by dipyridamole. *Biochem Pharmacol.* 36, 809-814.
- WAN, K.L., CARRUTHERS, V.B., SIBLEY, L.D. and AJIOKA, J.W. 1997. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol.* 84, 203-214.
- WEISS, L.M., LAPLACE, D., TAKVORIAN, P.M., CALI, A., TANOWITZ, H.B., WITTNER, M. 1994. Development of bradyzoites of *Toxoplasma gondii* in vitro. *J Eukaryot Microbiol.* 41: 18S.

- WEISS, L.M., LAPLACE, D., TAKVORIAN, P.M., TANOWITZ, H.B., CALI, A., WITTNER, M. 1995. Cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol.* 42: 150-157.
- WEISS, L.M., KIM, K. 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 5, D391-405.
- WENG, L.X., FU, X.B., LI, X.X., SUN, T.Z., ZHENG, S.Y., CHEN, W. and LI, J.Y. 2005. [Protective effects of acidic fibroblast growth factor on intestinal ischemia/reperfusion in rats.]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 17, 98-101.
- WHITEHEAD, R.H., JONES, J.K., GABRIEL, A. and LUKIES, R.E. 1987. A new colon carcinoma cell line (LIM1863) that grows as organoids with spontaneous differentiation into crypt-like structures in vitro. *Cancer Res.* 47, 2683-2689
- WONG, S.Y. and REMINGTON, J.S. 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS.* 7, 299-316.
- YAMAMOTO, J.K., PU, R., ARAI, M., POLLOCK, D., IRAUSQUIN, R., BOVA, F.J., FOX, L.E., HOMER, B.L. and GENGOZIAN, N. 1998. Feline bone marrow transplantation: its use in FIV-infected cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 65, 323-351.
- ZHANG, Y.W., HALONEN, S.K., MA, Y.F., WITTNER, M., WEISS, L.M. 2001. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun.* 69, 501-507.
- ZHANG, Y.W., HALONEN, S.K., MA, Y.F., TANOWITZ, H.B., WEISS, L.M. 2010. A Purification Method for Enrichment of the *Toxoplasma gondii* Cyst Wall. *J Neuroparasitology.* 1, 1-6.

*Anexo*

**Anexo: Interaction of *Toxoplasma gondii* bradyzoites and feline epithelial cells induces differentiation of cysts and syncytial forms**

Renata Morley de Muno, Marcos de Assis Moura, Sergio H. Seabra and Helene Santos Barbosa



Submissions Being Processed for Author HELENE Santos BARBOSA, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View QC Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>		Interaction of Toxoplasma gondii bradyzoites and feline epithelial cells induces differentiation of cysts and syncytial forms	04 Aug 2011	04 Aug 2011	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

<< Author Main Menu

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal for Parasitology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Interaction of *Toxoplasma gondii* bradyzoites and feline epithelial cells induces differentiation of cysts and syncytial forms

Article Type: Full Length Article

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Feline enterocytes; parasitophorous vacuole; tubulovesicular membrane network; cysts; CRFK line

Corresponding Author: Dr. HELENE Santos BARBOSA, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Lab. Biologia Estrutural - Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz

First Author: Renata M Munro, MSc

Order of Authors: Renata M Munro, MSc; Marcos A Moura, PhD; Sergio H Seabra, PhD; HELENE Santos BARBOSA, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

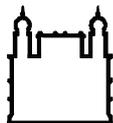
**Abstract:** Felids are the only definitive hosts of *Toxoplasma gondii*, a Coccidian protozoan. It maintains its sexual life cycle in the felid gut and yields sporozoites within stable oocysts into the environment. In this work, primary cultures of FIEC and epithelial cell lines were infected with the bradyzoite forms of *T. gondii*. Three different infective loads (1:5; 1:10; 1:20 parasite-host cell ratio) demonstrated that FIEC was more susceptible to infection compared to CRFK. The intracellular fate of *T. gondii* was dependent on the parasite/host cell ratio in both cells: (i) with the ratio 1:5, the bradyzoites differentiated into tachyzoites that proliferated intensely, causing lysis of the host cell; (ii) with the ratio 1:10 and 1:20, the cystogenesis was established with the intracellular formation of cysts and, (iii) with the ratio 1:20, vacuoles with one or more parasites inside a vacuolar matrix containing a well developed tubulovesicular membrane network (TMN), like schizont forms. Additionally, some large vacuoles containing parasites were seen in asynchronous division. Structures similar to schizont types C and E of *T. gondii* were observed in CRFK cells. Feline epithelial cells from different sources influence the intracellular fate which is also dependent on the parasite load. This is an area for further research in parasite cellular biology.

Suggested Reviewers: Lais Carvalho PhD  
Professor, Embriologia e Histologia, UERJ  
ldc29@globocom  
She is expert in cell biology and parasitology.

Jitender P Dubey PhD  
Professor, Agriculture, Animal and Natural Resources Institut  
Jitender.Dubey@ars.usda.gov  
He is the best protozoologist on the area of Experimental toxoplasmosis.

Maria de Nazaré C Soeiro PhD

Research, Lab. Biologia Celular, Fiocruz  
soeiro@ioc.fiocruz.br  
She is expert in cell biology.



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

---

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

*Laboratório de Biologia Estrutural*

---

Int J Parasitol

Lab. Biologia Estrutural  
Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ  
Av. Brasil 4365 - CEP 21045-360  
Rio de Janeiro – Brasil

August 04- 2011

Dear Editor

Please find attached the paper: “Interaction of *Toxoplasma gondii* bradyzoites and feline epithelial cells induces differentiation of cysts and syncytial forms” by Renata Morley de Munro, Marcos de Assis Moura, Sergio H. Seabra and Helene Santos Barbosa to be submitted for publication in Int J Parasitol.

Sincerely yours,

Dra. Helene Santos Barbosa

Lab. Biologia Estrutural  
Instituto Oswaldo Cruz  
FIOCRUZ  
Av. Brasil 4365 - CEP 21045-900  
Rio de Janeiro - Brasil  
Tel fax: 021 2260 4434  
2598.4413  
25984330

**Abstract** – Felids are the only definitive hosts of *Toxoplasma gondii*, a Coccidian protozoan. It maintains its sexual life cycle in the felid gut and yields sporozoites within stable oocysts into the environment. In this work, primary cultures of FIEC and epithelial cell lines were infected with the bradyzoite forms of *T. gondii*. Three different infective loads (1:5; 1:10; 1:20 parasite-host cell ratio) demonstrated that FIEC was more susceptible to infection compared to CRFK. The intracellular fate of *T. gondii* was dependent on the parasite/host cell ratio in both cells: (i) with the ratio 1:5, the bradyzoites differentiated into tachyzoites that proliferated intensely, causing lysis of the host cell; (ii) with the ratio 1:10 and 1:20, the cystogenesis was established with the intracellular formation of cysts and, (iii) with the ratio 1:20, vacuoles with one or more parasites inside a vacuolar matrix containing a well developed tubulovesicular membrane network (TMN), like schizont forms. Additionally, some large vacuoles containing parasites were seen in asynchronous division. Structures similar to schizont types C and E of *T. gondii* were observed in CRFK cells. Feline epithelial cells from different sources influence the intracellular fate which is also dependent on the parasite load. This is an area for further research in parasite cellular biology.

## HIGHLIGHTS

The experimental strategies implemented in this work reproduced *in vitro* the natural microenvironment established during development of the parasite in the intestines of the definitive host, the domestic cat. This feature can really represent the first disclosure of at least partial reproducibility of the enteric cycle of *T. gondii in vitro*. The introduction of the feline epithelial cells as the cellular model employed in this study showed that they can contribute to new studies on the cell biology of the parasite. In other words, the FIEC or feline epithelial cells are alternative methodologies to better understand the enteric cycle of *T. gondii* under controlled conditions; also this is an open field for investigation into the molecular aspects of this interaction that can contribute, for example, to the developing of new strategies to intervene in one of the main routes that spreads toxoplasmosis.

1 Short title: *T. gondii*-feline epithelial cells interaction

2

3

4 Interaction of *Toxoplasma gondii* bradyzoites and feline epithelial cells

5 induces differentiation of cysts and syncytial forms

6 Renata Morley de Muno<sup>1</sup>, Marcos de Assis Moura<sup>1</sup>, Sergio H. Seabra<sup>2</sup> and Helene

7 Santos Barbosa<sup>1\*</sup>

8

9

10

11 Address: <sup>1</sup>Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação

12 Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-361, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de

13 Tecnologia em Cultura de Células, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, RJ

14 21070-200, Brazil.

15

16

17

18 \*Corresponding author: [helene@ioc.fiocruz.br](mailto:helene@ioc.fiocruz.br)

19

20

21

22

23

24       **Abstract** – Felids are the only definitive hosts of *Toxoplasma gondii*, a Coccidian  
25 protozoan. It maintains its sexual life cycle in the felid gut and yields sporozoites within  
26 stable oocysts into the environment. In this work, primary cultures of FIEC and epithelial  
27 cell lines were infected with the bradyzoite forms of *T. gondii*. Three different infective  
28 loads (1:5; 1:10; 1:20 parasite-host cell ratio) demonstrated that FIEC was more  
29 susceptible to infection compared to CRFK. The intracellular fate of *T. gondii* was  
30 dependent on the parasite/host cell ratio in both cells: (i) with the ratio 1:5, the bradyzoites  
31 differentiated into tachyzoites that proliferated intensely, causing lysis of the host cell; (ii)  
32 with the ratio 1:10 and 1:20, the cystogenesis was established with the intracellular  
33 formation of cysts and, (iii) with the ratio 1:20, vacuoles with one or more parasites inside a  
34 vacuolar matrix containing a well developed tubulovesicular membrane network (TMN),  
35 like schizont forms. Additionally, some large vacuoles containing parasites were seen in  
36 asynchronous division. Structures similar to schizont types C and E of *T. gondii* were  
37 observed in CRFK cells. Feline epithelial cells from different sources influence the  
38 intracellular fate which is also dependent on the parasite load. This is an area for further  
39 research in parasite cellular biology.

40       Keywords: *Toxoplasma gondii*; Feline enterocytes; parasitophorous vacuole;  
41 tubulovesicular membrane network; cysts; CRFK line

42

43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68

## 1. Introduction

*Toxoplasma gondii* is an intracellular protozoan, a parasite that infects different species of mammals and birds (Dubey, 1998a). Asexual reproduction of the parasite takes place in these animals, characterizing them as intermediate hosts (Black and Boothroyd, 2000; Lehmann et al., 2000). The sexual cycle or enteroepithelial stage of *T. gondii* occurs exclusively in domestic cats and other felines (Dubey et al., 2004). These are considered definitive hosts and the processes of schizogony, gametogony and sporogony take place in the intestinal epithelium, which results in the formation of immature oocysts that are eliminated together with the feces of the felines (Dubey and Frenkel, 1972; Dubey, 1973; Dubey and Frenkel, 1973; Dubey et al., 1988).

Domestic cats can liberate oocysts after ingesting any infective form of *T. gondii*: tachyzoites, bradyzoites or sporozoites. The time to eliminate oocysts after the infection and the frequency of the release of oocysts depends on the infective form ingested: 3 to 10 days after ingesting tissue cysts, 13 days after ingesting tachyzoites and 18 or more days after ingesting oocysts (Dubey and Frenkel, 1972; Dubey and Frenkel, 1973; Dubey and Welcome, 1988). After the ingestion of tissue cysts, the cyst wall is destroyed by proteolytic enzymes of the stomach and intestine. Then, the bradyzoites are released and penetrate into the intestinal cells initiating the development of several generations of *T. gondii* (Dubey and Frenkel, 1972). However the induction mechanisms of the sexual cycle are still unknown.

Five distinct morphological types of parasites appear exclusively in felines that are enteroepithelial stages or schizonts of *T. gondii* (Types: A, B, C, D and E). The stage E differentiates to the micro- and macrogametocytes that after fusion give origin to the immature oocyst in the intestinal epithelium of felines and are eliminated, still immature, together with the feces of the definitive host into the environment (Dubey and Frenkel, 1972; Frenkel and Dubey, 1972; Lindsay et al., 1991).

69 The morphological characterization of the sexual reproduction of *T. gondii* observed  
70 in the gut of neonate cats has been developed in *in vivo* systems (Dubey and Frenkel,  
71 1972; Ferguson et al., 1974; 1975; Speer and Dubey, 2005; Ferguson, 2009) and some  
72 molecular aspects have been explored (Ferguson, 2004). During the enteroepithelial  
73 process, the host cell also shows ultrastructural differences in relation to parasitophorous  
74 vacuole morphology (Dubey et al., 1998; Weiss and Kim, 2000; Speer and Dubey, 2005).  
75 The present work is pioneer and shows for the first time, in feline epithelial cells, the *in*  
76 *vitro* development of some *T. gondii* stages: tachyzoites, bradyzoites and the syncytial  
77 forms similar to those described *in vivo*.

78

## 79 **2. Materials and Methods**

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

84

### 85 **2. 1. Primary cultures of feline intestinal cells (Moura et al., 2009)**

86 Primary cultures of feline intestinal epithelial cells were obtained from the fetus of a  
87 clinically healthy pregnant domestic cat (no gastrointestinal disease and serologically  
88 negative for *T. gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus). The  
89 samples of small intestine were collected aseptically corresponding to the jejunum-ileum  
90 region. The fragments were placed for 20 min under agitation at room temperature in a  
91 nonenzymatic dissociation solution (pH 7.2) containing 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM  
92 dithiothreitol and 10% antibiotic solution (Perreault and Jean-Francois, 1996; Macartney et  
93 al., 2000; Aldhous et al., 2001; Rusu et al., 2005). The cell aggregates were plated in  
94 DMEM/Hams medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Hams Nutrient F12 (1:1)

95 containing 10% antibiotic solution, 1 mM glutamine, 10% bovine fetal serum and 20 ng/ml  
96 epidermal growth factor (Sanderson et al., 1996; Aldhous et al., 2001). The cultures were  
97 maintained at 37°C incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and the medium was renewed  
98 every two days.

99

## 100 **2.2. Epithelial cell lines**

101 CRFK epithelial cell line from normal epithelium of the renal cortex of *Felis catus*  
102 (domestic cat) (BCRJ N° CR0268) was used. The cells were acquired from Rio de Janeiro  
103 Cell Bank (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br>).

104 CRFK was plated at a concentration of  $1.0 \times 10^5$  cells/ml in 25 cm<sup>3</sup> bottles (Gibco  
105 BRL, UK) in DMEM/Hams F12 medium (1:1) (Sigma-Aldrich) containing 1% antibiotic  
106 solution (Sigma-Aldrich) and 10% bovine fetal serum. The cells were incubated at 37°C in a  
107 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Every two days, half the medium was discarded and the same  
108 volume of fresh medium added. The cells were cultivated until they reached approximately  
109 80% confluence. At this point, the cells were treated for 10 min at 37°C with dissociation  
110 solution (PBS with 0.01% EDTA and 0.25% trypsin). After dissociation the cells were  
111 placed in culture medium at 4°C with 10% bovine fetal serum to inhibit the action of trypsin,  
112 centrifuged for 7 min at 650g at 4°C and were grown in 24-well plates on coverslips ( $8 \times 10^4$   
113 cells/ well).

## 114 **2.3. Isolation of tissue cysts and bradyzoites**

115 *T. gondii* cysts from the ME-49 strain (Type II) were inoculated intraperitoneally into  
116 C57BL/6 female mice (15-18 g) with 50 cysts/animal. After 4 and 12 weeks post-infection  
117 the mice were sacrificed and the brain cysts isolated, as described by Freyre (1995) and  
118 Popiel et al. (1996) and modified by Guimarães et al. (2007, 2008). Bradyzoites were  
119 obtained from isolated tissue cysts (for details see Guimarães et al., 2008).

120

121           **2.4. Interaction *T. gondii* – Feline Intestinal Epithelial Cells (FIEC) and epithelial**  
122 **cell lines**

123           Confluent FIEC and CRFK cultures were infected with bradyzoites of *T. gondii*. The  
124 assays were performed at ratios of 1:5, 1:10 or 1:20 (parasite-host cell) for periods ranging  
125 from 1 to 13 dpi in order to analyze the course of infection and also to evaluate the  
126 intracellular fate of the parasites morphologically. After the interaction periods, the cells  
127 were washed in PBS and processed according to the experiments to be carried out.

128           The ability of *T. gondii* bradyzoites to infect CRFK cells and enterocytes *in vitro* was  
129 tested by fixation of the cells in Bouin's solution and stained by Giemsa solution. The  
130 infection analysis was carried out with a total of 400 cells per coverslip for three  
131 independent experiments, at interaction times of 24, 48, 72 and 96 h, in duplicate. The  
132 statistical analysis used the ANOVA one way with the Student-Newman-Keuls test. Values  
133 are presented as mean  $\pm$  SD. The results were considered significant when  $P < 0.05$ .

134

135           **2.5. The characterization of *T. gondii* stages by immunolabeling**

136           The differentiation of parasites in culture cells infected with bradyzoite forms [ratio 1:5  
137 and 1:10 (parasite-host cell)] was monitored using stage-specific antibodies and lectin.  
138 Tachyzoites were identified by immunostaining with antibodies anti-SAG-1 (kindly provided  
139 by Dr. José Roberto Mineo - Immunoparasitology Laboratory, Federal University of  
140 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil) and cysts of *T. gondii* were identified with lectin DBA  
141 conjugated to TRITC (Sigma-Aldrich Co. L6533), which binds to N-acetyl-galactosamine  
142 groups (Zhang et al., 2001). Initially, the cultures were fixed for 20 min at 4°C on days 1 to  
143 13 with 4% PFA in PBS, washed three times for 10 min in PBS and then to block free  
144 aldehyde radicals were incubated for 30 min in 50 mM ammonium chloride. After which the  
145 cells were permeabilized for 20 min with PBS solution containing 0.05% Triton X-100  
146 (Roche) and 4% BSA (Sigma-Aldrich Co.) to block nonspecific binding. For the indirect

147 immunofluorescence assay, the host cells were incubated for 2 h at 37°C with primary  
148 antibody anti-SAG-1 diluted 1:200 in PBS/BSA. After incubation the cells were washed  
149 with PBS containing 4% BSA and incubated for 1 hour at 37°C with secondary antibody at  
150 a dilution of 1:1000 (anti-mouse IgG conjugated with FITC-F5262) or TRITC (T5393  
151 Sigma-Aldrich). For direct fluorescence DBA lectin-TRITC (1:200 dilution) in PBS was  
152 used. In some tests in order to reveal the actin filaments, the cell cultures were incubated  
153 in PBS for 1h at 37°C with 4 g/ml phalloidin-FITC (P5282 Sigma-Aldrich Co.) at a dilution  
154 of 1:400. Afterwards, the cultures were washed 3 times for 10 min in PBS, incubated in 0.1  
155 µg/mL with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, an intercalate of DNA, Sigma-Aldrich Co.)  
156 diluted 1:10,000 in PBS for 5 min. After washing in PBS, the coverslips were then mounted  
157 on slides with a solution of 2.5% DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane-  
158 triethylenediamine antifading, Sigma Chemical Co.) in PBS containing 50% glycerol, pH  
159 7.2. Controls were performed by omission of the primary antibody and for the lectin DBA a  
160 competitive reaction with the addition of 50 mM N-acetyl-galactosamine (GalNAc) was  
161 carried out. The samples were examined under a confocal laser scanning microscope  
162 (CLSM Axiovert 510, META, Zeiss, Germany) using a 543 Helium laser (LP560 filter), 488  
163 Argon/Krypton laser (Ar/Kr) (filter LP515) and a 405 Diiod laser (LP 420 filter).

164

## 165 **2.6. Ultrastructural analyzes**

166 For ultrastructural analyzes cell cultures infected with bradyzoites of *T. gondii* (1:10 or  
167 1:20 parasites-host cell ratio) were used. These parasites-host cell ratios were the ratios  
168 that increased the incidence of cysts *in vitro* as demonstrated by kinetic studies. The cells  
169 were washed 3 times for 10 min with PBS and fixed for 1 h at 4°C in 2.5% glutaraldehyde  
170 diluted in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 3.5% sucrose and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (pH  
171 7.2). After fixation, the cells were washed in the same buffer and then post-fixed for 30 min  
172 at room temperature in 1% osmium tetroxide diluted in 0.1 M cacodylate buffer. For

173 transmission electron microscopy (TEM) analyses, the cells were washed in the same  
174 buffer and scraped at 4°C from the plastic dish and centrifuged for 5 min at 10,000 g.  
175 Thereafter, the cells were dehydrated in graded acetone and embedded in Epoxy resin  
176 (PolyBed 812). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then  
177 examined under a transmission electron microscope Jeol JEM1011. For scanning electron  
178 microscopy (SEM), the infected cell cultures were fixed for 30 min at room temperature with  
179 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) and post-fixed for 30 min at  
180 room temperature with a solution of 1% OsO<sub>4</sub> containing 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> in the same buffer.  
181 The cells were dehydrated in an ascending acetone series and dried by the critical point  
182 method with CO<sub>2</sub> (CPD 030, Balzers, Switzerland) and the monolayer was gently scraped  
183 with Scotch tape (Flood, 1975) to expose the cytoplasmic face of the cell. The scraped  
184 portion of the cells, which remained adhered to the tape, was also observed. The samples  
185 were mounted on aluminum stubs, coated with a 20 nm thick gold layer and examined in  
186 Jeol JSM6390LV and JSM 6490LV scanning electron microscopes (Tokyo, Japan). The  
187 samples were analyzed at the Electron Microscopy Platform of Instituto Oswaldo Cruz and  
188 Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

189

190

### 3. Results

191

192

193

194

195

196

197

198

The analysis of the bradyzoites-FIEC interaction at the 1:5 ratio, showed that the inoculated parasites were maintained as bradyzoites within the parasitophorous vacuole (PV) for 24 hpi, as revealed by negative reaction for tachyzoites, using antibodies anti-SAG1 (Fig. 1A). The bradyzoite-tachyzoite conversion occurred at 48 hpi when vacuoles containing parasites (SAG-1+) were seen (Fig. 1B). The revelation of actin filaments using phalloidin-FITC allows us to observe that the VP does not compromise the FIEC alignment and polarization (Fig. 1B). The lytic cycle of *T. gondii* was characterized by the disruption of FIEC at 96 hpi and the release of tachyzoites into the medium (Fig. 1C).

199 Quantitative analysis of the capacity of bradyzoites of *T. gondii* strain ME49 to infect  
200 FIEC and the CRFK line (1:5 parasite-cell ratio) was performed from 24 to 96 hpi. The data  
201 in Figure 2 show the influence of the parasite load on the number of infected enterocytes  
202 over the time studied: 24 h (29 cells) and 96 h (169 cells). The results obtained using the  
203 ratios 1:10 and 1:20 demonstrated a lower number of infected enterocytes (Fig. 2). The  
204 behavior of bradyzoites in the CRFK line was similar to the results described for FIEC but  
205 the ability of the parasites to infect CRFK was lower (Fig. 3). These data demonstrated that  
206 regardless of the host cell-parasite ratio, FIEC are more susceptible to infection by  
207 bradyzoites of *T. gondii* than the CRFK line (Fig. 2 and 3). These differences were  
208 considered statistically significant ( $P < 0.05$ ).

209 Another aspect observed in both cell cultures was the establishment of the  
210 cystogenesis as shown in Figures 2 and 3. As seen by phase contrast microscopy the  
211 formation of cyst-like intracellular structures in the enterocytes occurred after 3 dpi (Fig. 4A)  
212 and 6dpi (Fig. 4B) using the ratio 1:10 (parasite-host cell). The cytochemical assays, using  
213 the lectin DBA conjugated to TRITC that recognizes the bradyzoites in a cyst-like structure,  
214 gave a positive reaction indicating the establishment of cystogenesis *in vitro* at 6 dpi (Fig.  
215 4C). Additionally, the enterocytes infected at 6 dpi and incubated simultaneously with  
216 antibody anti-SAG-1, under the same experimental conditions, showed that there were  
217 tachyzoite and bradyzoite forms inside some of these cysts, characterizing them as mixed  
218 cysts, which was also observed in serial sections obtained by confocal microscopy (Fig.  
219 4Ca-f).

220 Similar results were obtained with the CRFK line infected with bradyzoites of *T. gondii*  
221 and stained with Giemsa at 96 hpi showing the presence of cyst-like (CL) structures with  
222 the infective load of 1:10 (parasite-cell ratio) (Fig. 5A). The cytochemical assays using the  
223 lectin DBA conjugated to TRITC revealed the cyst wall at 10 dpi. In the same culture,  
224 tachyzoites were also observed in typical rosettes forms as revealed by SAG + (Fig. 5B).

225 Infected cultures of CRFK maintained until 13 dpi showed reactivity for lectin DBA with  
226 positive results for cyst wall and also bradyzoites indicating that cystogenesis was well  
227 establishment *in vitro*. This was observed in various infected cells (Fig. 5B-F).

228 Samples of CRFK cultures after 8 dpi processed for SEM and scrapped with Scotch  
229 tape showed VPs containing tachyzoites in a typical rosette formed by daughter cells and  
230 connected to the residual body by their posterior ends (Fig.6A). At 10 dpi the  
231 tubulovesicular membrane network (TMN) was widespread and was anchoring the  
232 parasites to the intern vacuolar membrane as well as covering the parasites (Fig. 6B).

233 At 13 dpi it was possible to identify intravacuolar structures of various sizes containing  
234 parasites with overlapping features, like to cysts showing that the *T. gondii* cystogenesis  
235 had established itself spontaneously in these cells (Fig. 7A).

236 SEM analysis of these cultures identified and characterized some cyst structures:  
237 membrane modification and high electrodense PV matrix, parasites with amylopectin  
238 granules, a large amount of micronemes and electrodense rhoptries (Fig. 7B). Some of  
239 these host cells had little cytoplasm, which is evidence of cell death probably caused by  
240 nutrient depletion due to advanced infection, as shown in Figure 7C, although the  
241 parasites are very well preserved indicating their cellular integrity.

242 As described during the quantitative analyses, syncytial forms of *T. gondii* were  
243 observed in FIEC using 1:20 (parasite-host cell ratio) (Fig. 2). This information was  
244 confirmed by TEM demonstrating that infected FIEC cultures presented parasitophorous  
245 vacuoles containing parasites with morphological types such as the enteroepithelial stages  
246 of *T. gondii* in felids. The PV presented a weak aspect, with a large and well developed  
247 TMN, occupying the entire vacuole matrix (Fig. 8A). TMN can be seen in detail in the  
248 Figure 8B. Endoplasmatic reticulum profiles, mitochondria and lipid bodies of the host cell,  
249 associated to the parasitophorous vacuole membrane, were also frequently observed (Figs.

250 8A-C). Some intracellular parasites presented asynchronous division, without typical  
251 rosette formations (Figs. 8C).

252 As demonstrated before, during the quantitative analysis of CRFK infection in the first  
253 96 hpi syncytial intracellular forms were not observed (Fig. 2), but at 7 dpi ultrathin sections  
254 revealed parasitophorous vacuoles containing a highly developed intravacuolar network  
255 similar to type B schizonts as described *in vivo* during the enteroepithelial cycle of *T. gondii*  
256 in felines (Fig. 9A and B). Other characteristics observed at 9 days of interaction was the VP  
257 containing parasites at various stages of differentiation: (i) morphology compatible with  
258 bradyzoites of *T. gondii*, especially a large amount of amylopectin granules (Fig. 9C); (ii) a  
259 round multinucleated structure with a large volume closely associated with the PVM  
260 containing amylopectin granules, lipid bodies and small vesicles that appear to spring from  
261 this structure in pellicular protrusions (Fig. 9C) which might correspond to type C schizonts  
262 of the *T. gondii* enteroepithelial stage. Other vacuoles after 9 days of infection showed  
263 many parasites which were in disarray and noticeably smaller than the standard sized  
264 parasites (Fig. 9D) and whose characteristics were compatible with the type E schizonts as  
265 described *in vivo*.

266

#### 267 **4. Discussion**

268 This work shows the infection of *T. gondii* bradyzoites in feline epithelial cells *in vitro*.  
269 The choice of bradyzoite forms as the infective stage to interact with the FIEC and the  
270 CRFK line is justified because it represents one of the natural ways that *T. gondii* is  
271 transmitted: via the consumption of raw meat by carnivorous animals or humans. The study  
272 of infections with bradyzoites *in vitro* is little used, probably because the methodology of  
273 isolation and purification is a long process and involves a reasonably large number of  
274 animals. Another key point of this work is the introduction of FIEC for the first time as the  
275 cellular model with the aim to study the *T. gondii* enteric cycle.

276 The statistical analysis demonstrated that FIEC have a higher susceptibility to  
277 infection by *T. gondii* bradyzoites than CRFK cells. This finding can be confirmed by the  
278 molecular and physiological characteristics of the original tissue preserved in cells from  
279 primary cultures, when compared to all other cell lines. Our data indicate the possibility  
280 that the cellular model used here is one of the main factors in this work to elucidate  
281 determinants of the intracellular cycle of *T. gondii*, as demonstrated recently by our group  
282 using primary cultures of skeletal muscle during the development of cystogenesis  
283 (Guimarães et al., 2008; reviewed in Ferreira-da-Silva et al., 2008, 2009a, b) and also in  
284 primary cultures of brain tissue (Fischer et al., 1997, Kurz et al. 1998; Lüder et al., 1999).  
285 The high affinity of the parasites for FIEC and CRFK cells reflects the molecular  
286 mechanisms in cats which determine the intracellular fate of parasites: lytic cycle,  
287 cystogenesis or schizont development. The high affinity of the parasites for FIEC and  
288 CRFK cells reflects the molecular mechanisms in cats which determine the intracellular  
289 fate of parasites: lytic cycle, cystogenesis or schizont development.

290 The use of probes that identify the intracellular stages of *T. gondii* showed that the  
291 number of parasites per cell used during the interaction assays is one determinant of the  
292 intracellular fate of the parasite in both cell types and that this ratio can generate: (i) the  
293 development of the lytic cycle of the parasite, with the ratio 1:5 (parasite-host cell), due to  
294 bradyzoites differentiation into tachyzoites, culminating with their intensive proliferation and  
295 causing lysis of the host cell; (ii) the establishment of cystogenesis: intracellular cyst  
296 formation with the ratio 1:10 (parasite-host cell) and, (iii) the development of different  
297 stages/morphological stages of *T. gondii*, like the enteroepithelial cycle of the parasite, with  
298 the ratio 1:20 (parasite-host cell).

299 *In vitro* experiments have shown that independently of the infective form (tachyzoites,  
300 bradyzoites or sporozoites), some parasites initially replicate quickly as tachyzoites to  
301 amplify the infection, as described by Dubey (1997c). FIEC infected with bradyzoites of

302 ME49 strain at the ratio 1:5 parasite-host cell were seen, by detection of SAG-1, to convert  
303 bradyzoites into tachyzoites at 48 hpi in more than 95% of intracellular parasitic forms,  
304 similar to the results obtained *in vivo* (Dubbey and Frenkel, 1973). The conversion of  
305 bradyzoites to tachyzoites is a natural process from 15 hpi in cell cultures without the  
306 addition of immunomodulatory substances (Gross et al., 1996). The lysis of the FIEC and  
307 CRFK cells at 96 hpi liberating tachyzoites, converted from bradyzoites, as shown here,  
308 characterizes the lytic cycle of *T. gondii*, confirming the results obtained by Dzierszinski et  
309 al. (2004) when the lysis of the cell lines infected with VEG strain tachyzoites at 72-96 hpi  
310 was observed.

311 The high rate of conversion and the establishment of cystogenesis *in vitro* is  
312 dependent on experimental intervention, such as temperature increase or pH change as  
313 first proposed by Soête et al. (1993, 1994) and confirmed by Dzierszinski et al. (2004).  
314 Some authors consider that cystogenesis is a spontaneous event dependent on the strain  
315 of *T. gondii* as in avirulent strains (type III) such as ME49 which has a natural ability to  
316 form cysts in mammalian cell cultures (McHugh et al., 1993; Darde et al., 1989; Lindsay et  
317 al., 1991). However, this question has not been fully answered. Although our recent review  
318 has opened the discussion stating that the cell type could be one of the factors  
319 determining the intracellular parasite route (Ferreira-da-Silva et al., 2008, 2009a). Our  
320 results here have shown for the first time that decreasing the parasite ratio to 1:10  
321 (bradyzoites-host cell) causes the formation of well defined intracellular cysts, up 6 dpi  
322 spontaneously, without any modulation: physical, chemical or immunological of the cell  
323 cultures, similar to the recently described use of skeletal muscle cells as host cells  
324 (Ferreira-da-Silva et al, 2008, 2009a, 2009b).

325 During infection with bradyzoites forms of the ME49 strain, some of these parasites  
326 did not form tissue cysts directly, but differentiated into tachyzoites transiently, then  
327 amplified the infection followed by bradyzoites interconversion initiating cystogenesis

328 (Ferreira-da-Silva et al., 2008, 2009; Guimarães et al., 2008). Based on these  
329 observations, our data suggested that the cystogenesis *in vitro* is an event dependent on  
330 several factors, including the strain, the parasite load and cell type or the interaction of  
331 these factors, which could be considered crucial for the establishment of the intracellular  
332 cycle of *T. gondii*. Another important fact is that it was also possible to observe the  
333 presence of syncytial forms associated with cyst formation using the parasitic load of 1:10  
334 (parasite-host cell) in our cellular models of cats. This promoted ultrastructural studies to  
335 explore the potential of cellular models and to characterize the enteroepithelial  
336 reproductive stages of *T. gondii*

337         The ultrastructural observation of FIEC and CRFK cultures in assays using the ratio  
338 1:10 or 1:20 (parasite-host cell) infected with bradyzoites, revealed morphological  
339 characteristics decidedly different from that described in other cell types. One of the main  
340 morphologic observations was the extremely well develop tubulovesicular membrane  
341 network in the PV in accordance with the *in vivo* description made previously by Speer and  
342 Dubey (2005). This is the main argument reinforcing the fact that the reproduction of the  
343 enteric cycle of *T. gondii in vitro* can be obtained under our experimental conditions  
344 associated with the cell type. Dense granules have been identified as organelles  
345 responsible for the secretion of proteins, which have been located in the interior of the PV  
346 and associated to the TMN, as soon as the parasite is completely inside the  
347 parasitophorous vacuole (Sibley et al., 1986; Cesbron-Delauw, 1994). The function of  
348 dense granule proteins has not totally yet been elucidated, in part because of the absence  
349 of a homology with proteins of a known function. However, some evidences suggest that  
350 the dense granule proteins are involved in the construction of the TMN (Sibley et al., 1995)  
351 and that this network participates in the metabolic exchanges between the parasite and  
352 the host cell, as well as in the transit of small molecules from the host cell cytosol to the

353 parasite or the export of proteins and/or lipids from the parasite to the MPV and/or host cell  
354 (Mercier, 2005).

355 Our observations of a very well developed TMN after the invasion of bradyzoites in  
356 FIEC and CRFK suggest that the presence of the parasites in these cellular models could  
357 be a signal for the induction of the enteroepithelial stages of *T. gondii*. The maintenance of  
358 TMN in PV is indicative that the parasites are alive (Sibley et al., 1986), considering that  
359 the association of TMN does not take place in PV containing dead or opsonized parasites  
360 (Jones et al., 1972; Nichols and O'Connor, 1981). The hypertrophy of the TMN in the PV  
361 described in FIEC does not have precedent in other mammal cellular models studied. This  
362 finding strongly suggests that the molecular signaling or modulation to trigger the  
363 differentiation of bradyzoites / schizont type A to type B is taking place, as has been  
364 recently described in the intestine of cats *in vivo*, 3-6 days post infection (Speer and  
365 Dubey, 2005). This hypothesis could also suggest that this differentiation is associated  
366 with the molecular aspects present or absent, which could be restricted to cats, thereby  
367 favoring the differentiation of parasites in their enteroepithelial stages that occur  
368 exclusively in the definitive hosts.

369 A fact that deserves comment was the diversity of morphological characteristics of  
370 the parasites inside the same vacuole during ultrastructural analysis in CRFK cultures  
371 infected with bradyzoites forms with the 1:10 parasite-host cell ratio load. The  
372 morphological characteristics of intravacuolar parasites were decidedly different from  
373 those described so far with other cell types: vacuolar parasites embedded in a matrix with  
374 no MTV, with a larger format, with more than one nucleus, relatively large lipid bodies,  
375 dense granules and some amylopectin granules that are compatible with schizont type C,  
376 similar to what was described in the intestine of cats *in vivo*, 3-6 days post-infection (Speer  
377 and Dubey, 2005). Another aspect observed was the presence of intravacuolar parasites,  
378 smaller than tachyzoites and bradyzoites, some with a round format and quite similar to

379 the morphological characteristics previously described for schizont type E, identified by  
380 Speer and Dubey (2005).

381 The experimental strategies implemented in this work reproduced *in vitro* the natural  
382 microenvironment established during development of the parasite in the intestines of the  
383 definitive host, the domestic cat. This feature can really represent the first disclosure of at  
384 least partial reproducibility of the enteric cycle of *T. gondii in vitro*. The introduction of the  
385 feline epithelial cells as the cellular model employed in this study showed that they can  
386 contribute to new studies on the cell biology of the parasite. In other words, the FIEC or  
387 feline epithelial cells are alternative methodologies to better understand the enteric cycle of  
388 *T. gondii* under controlled conditions; also this is an open field for investigation into the  
389 molecular aspects of this interaction that can contribute, for example, to the developing of  
390 new strategies to intervene in one of the main routes that spreads toxoplasmosis.

391

### 392 **Acknowledgements**

393 We are grateful to Marielle Delfin Pereira, Sandra Maria de Oliveira Souza and  
394 Genesio Lopes de Faria for their technical assistance. This work was supported with grants  
395 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação  
396 Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ),  
397 Fundação Oswaldo Cruz (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES  
398 IV), Pronex - Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - CNPq/FAPERJ) and Instituto  
399 Oswaldo Cruz/Fiocruz.

400

401

402

**References**

- 404 Aldhous, M.C., Shmakov, A.N., Bode, J., Ghosh, S., 2001. Characterization of  
405 conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. Clin Exp  
406 Immunol 125, 32-40.
- 407 Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*.  
408 Microbiol Mol Biol Rev 64, 607-623.
- 409 Cesbron-Delauw, M.F., 1994. Dense-granule organelles of *Toxoplasma*  
410 *gondii*: their role in the host-parasite relationship. Parasitol Today 10, 293-296.
- 411 Darde, M. L., Bouteille, B., Leboutet, M. J., Loubet, A., Pestre-Alexandre, M.,  
412 1989. *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in  
413 human fibroblast culture. Ann Parasitol Hum Comp 64, 403-411.
- 414 Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J  
415 Protozool 19, 155-177.
- 416 Dubey, J.P., 1973. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of  
417 domiciled and stray cats. J Am Vet Med Assoc 162, 873-877.
- 418 Dubey J.P., 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage  
419 conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of  
420 different strains of *Toxoplasma gondii* , J Eukaryot Microbiol. 44:592-602.
- 421 Dubey, J.P., 1998a. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J  
422 Parasitol 28, 1019-1024.
- 423 Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1973. Experimental toxoplasma infection in mice  
424 with strains producing oocysts. J Parasitol 59, 505-512.
- 425 Dubey, J.P., Gendron-Fitzpatrick, A.P., Lenhard, A.L., Bowman, D., 1988.  
426 Fatal toxoplasmosis and enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* in a Pallas  
427 cat (*Felis manul*). J Protozool 35, 528-530.
- 428 Dubey, J.P., Welcome, F.L., 1988. *Toxoplasma gondii*-induced abortion in  
429 sheep. J Am Vet Med Assoc 193, 697-700.
- 430 Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma*  
431 *gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of  
432 tissue cysts. Clin Microbiol Rev 11, 267-299.
- 433 Dubey, J.P., Navarro, I.T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R.L., Kawabata,  
434 H.H., Vianna, M.C., Kwok, O.C., Shen, S.K., Thulliez, P., Lehmann, T., 2004.  
435 *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue

436 distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol* 90,  
437 721-726.

438 Dziarszynski F., Nishi M., Ouko L., Roos D.S., 2004. Dynamics of *Toxoplasma*  
439 *gondii* differentiation, *Eukaryot Cell*. 3:992-1003.

440 Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., 1974.  
441 Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony  
442 of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Pathol Microbiol Scand*  
443 [B] *Microbiol Immunol* 82, 167-181.

444 Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., Siim, J.C., 1975. The ultrastructural  
445 development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma*  
446 *gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 83, 491-505.

447 Ferguson, D.J., 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate  
448 stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host.  
449 *Int J Parasitol* 34, 347-360.

450 Ferguson D.J., 2009. *Toxoplasma gondii* : 1908-2008, homage to Nicolle,  
451 Manceaux and Splendore, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104:133-148.

452 Ferreira da Silva M.F., Barbosa H.S., Gross U., Lüder C.G., 2008. Stress-  
453 related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst.*  
454 4:824-834.

455 Ferreira-da-Silva, M.F., Rodrigues, R.M., Andrade, E.F., Carvalho, L., Groß, U.,  
456 Lüder, C. G., Barbosa, H. S., 2009a. Spontaneous stage differentiation of mouse-  
457 virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural  
458 evaluation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 140, 196-200.

459 Ferreira-da-Silva, M.F., Takács, A.C., Barbosa, H.S., Gross, U., Lüder, C.G.,  
460 2009b. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii*  
461 tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int. J. Med.*  
462 *Microbiol.* 299: 281-288.

463 Fischer, H. G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Gross, U. and Hadding, U., 1997.  
464 Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse  
465 brain. *Parasitol Res*, **83**, 637-641.

466 Frenkel, J.K., Dubey, J.P., 1972. Toxoplasmosis and its prevention in cats and  
467 man. *J Infect Dis* 126, 664-673.

468 Freyre, A. 1995. Separation of *Toxoplasma* cysts from brain tissue and  
469 liberation of viable bradyzoites. *Journal of Parasitology* 81: 1008–1010.

470 Gross U, Bohne W, Lüder CGK, Lugert R, Seeber F, Dittrich C, Pohl F,  
471 Ferguson DJP, 1996. Regulation of developmental differentiation in the protozoan  
472 parasite *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 43: 114S-116S.

473 Guimarães, E.V., Acquarone, M., de Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2007.  
474 Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and  
475 characterization. *Micron* 38, 651-658.

476 Guimarães, E.V., de Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2008. Primary culture of  
477 skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J*  
478 *Parasitol* 94, 72-83.

479 Jones, T.C., Yeh, S., Hirsch, J.G., 1972. The interaction between *Toxoplasma*  
480 *gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the  
481 parasite. *J Exp Med* 136, 1157-1172.

482 Kurz, B., Bockeler, W. and Buse, E., 1998. In vitro-model for *Toxoplasma*  
483 *gondii* invasion into neuroepithelial cells. *Ann Anat*, 180, 299-305.

484 Lehmann, T., Blackston, C.R., Parmley, S.F., Remington, J.S., Dubey, J.P.,  
485 2000. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and  
486 housekeeping genes. *J Parasitol* 86, 960-971.

487 Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., Mason, W.H., 1991. Prevalence  
488 and isolation of *Toxoplasma gondii* from white-tailed deer in Alabama. *J Parasitol*  
489 77, 62-64.

490 Lüder, C. G., Giraldo-velasquez, M., Sendtner, M. and Gross, U., 1999.  
491 *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons,  
492 astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage  
493 differentiation. *Exp Parasitol*, 93, 23-32.

494 Macartney, K.K., Baumgart, D.C., Carding, S.R., Brubaker, J.O., Offit, P.A.,  
495 2000. Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term  
496 culture, are susceptible to rotavirus infection. *J Virol* 74, 5597-5603.

497 McHugh T.D., Gbewonyo A., Johnson J.D., Holliman R.E., Butcher P.D., 1993.  
498 Development of an in vitro model of *Toxoplasma gondii* cyst formation, *FEMS*  
499 *Microbiol Lett.*, 114. 325-332.

500 Mercier, C., Adjogble, K.D., Daubener, W., Delauw, M.F., 2005. Dense  
501 granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole  
502 of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* 35, 829-849.

503 Moura M.A., Amendoeira, M.R., Barbosa, H.S., 2009. Primary culture of  
504 intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle  
505 studies. Mem Inst Oswaldo Cruz 104, 862-864.

506 Nichols, B.A., O'Connor, G.R., 1981. Penetration of mouse peritoneal  
507 macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active  
508 invasion and phagocytosis. Lab Invest 44, 324-335.

509 Perreault, N., Jean-Francois, B., 1996. Use of the dissociating enzyme  
510 thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. Exp  
511 Cell Res 224, 354-364.

512 Popiel, I., Gold M. C.; Booth K. S. 1996. Quantification of *Toxoplasma gondii*  
513 bradyzoites. Journal of Parasitology 82, 330–332.

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

517 Sanderson, I.R., Ezzell, R.M., Kedingler, M., Erlanger, M., Xu, Z.X., Pringault,  
518 E., Leon-Robine, S., Louvard, D., Walker, W.A., 1996. Human fetal enterocytes in  
519 vitro: modulation of the phenotype by extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A  
520 93, 7717-7722.

521 Sibley, L.D., Krahenbuhl, J.L., Adams, G.M., Weidner, E., 1986. *Toxoplasma*  
522 modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in  
523 surface proteins. J Cell Biol 103, 867-874.

524 Sibley, L.D., Niesman, I.R., Parmley, S.F., Cesbron-Delauw, M.F., 1995.  
525 Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-  
526 vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci  
527 108 ( Pt 4), 1669-1677.

528 Soète M., Fortier B., Camus D., Dubremetz J.F., 1993. *Toxoplasma gondii*:  
529 kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro, Exp Parasitol. 76, 259-264.

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

533 Speer, C.A., Dubey, J.P., 2005. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma*  
534 *gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed  
535 bradyzoites. Int J Parasitol 35, 193-206.

536 Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from  
537 animals to humans. Int J Parasitol 30, 1217-1258.

538 Weiss, L.M., Kim, K., 2000. The development and biology of bradyzoites of  
539 *Toxoplasma gondii*. Front Biosci 5, D391-405.

540 Zhang Y.W, Halonen S.K, Ma Y.F, Wittner M, Weiss L.M, 2001. Initial  
541 characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. Infect Immun.  
542 69, 501-507.

543

544

545 Legends to figures

546 Figure 1: Interaction of *Toxoplasma gondii* strain ME49 bradyzoites with FIEC in the  
547 ratio 1:5 parasite-host cell. (A) 24 hpi, the early formation of parasitophorous vacuoles (PV)  
548 containing bradyzoites, confirmed by immunostaining using antibodies anti-SAG1/TRITC  
549 (SAG1 -), in green actin filaments revealed by Phalloidine-FITC and in blue the nuclei  
550 visualized by stain with DAPI [Bar 10µm]; (B) 48 hpi shows the conversion of bradyzoites  
551 into tachyzoites by immunostaining (SAG1 +)[Bar 10µm]; (C) 96 hpi shows the lysis of  
552 FIEC with the liberation of tachyzoites from the cells (SAG1 +) [Bar 20µm]

553

554 Figure 2: Average number of FIEC infected with bradyzoites of *T. gondii* ME-49 strain  
555 using infective load of 1:5, 1:10 and 1:20 (parasite- host cell ratio); \*p< 0.05 ; ○  
556 cystogenesis; ◇ syncytial forms.

557

558 Figure 3: Average number of CRFK line infected with bradyzoites of *T. gondii* ME-49  
559 strain using infective load of 1:5, 1:10 and 1:20 (parasite- host cell ratio); \*p <0.05; ○  
560 cystogenesis.

561

562 Figure 4: Interaction of *T. gondii* strain ME49 bradyzoites and FIEC, in the ratio 1:10  
563 parasite-host cell. (A) Formation of cystic like structures after 3 dpi and (B) 6 dpi as seen by  
564 phase contrast microscopy; (C) Presence of cysts of *T. gondii* (revealed by lectin DBA-  
565 TRITC) in FIEC at 6 dpi. Sequential sections (Ca-Cf) demonstrate the formation of cysts  
566 containing bradyzoites (red) and tachyzoites (SAG+) (green). [Bar 20µm]

567

568 Figure 5: Interaction of *T. gondii* strain ME49 bradyzoites and CRFK, in the ratio 1:10  
569 parasite-host cell. (A) Formation of cystic like structures after 96 hpi stained with Giemsa  
570 (thin arrow). Note that some parasites were found near the cystic like structures

571 (arrowhead) [Bar 20µm]; (B) Presence of cysts of *T. gondii* revealed by lectin DBA-TRITC  
572 (thin arrow), in blue the nuclei of parasites visualized by stain with DAPI (thick arrow) and in  
573 green tachyzoites revealed by antibody anti-SAG + [Bar 10µm]; (CF) Cysts of *T. gondii* in  
574 CRFK after 13 days of infection. (CD) Reconstruction and section of the same cyst  
575 revealed by immunostaining with TRITC-lectin DBA clearly showing the cyst wall (thin  
576 arrow) and in blue the nuclei of parasites (thick arrow). (EF) Reconstruction and section of  
577 other cysts revealed by immunostaining with TRITC-lectin DBA (thin arrow) and in blue the  
578 nuclei of parasites (thick arrow) and the nuclei of the host cells. [Bar 5µm]

579

580 Figure 6: Interaction of *T. gondii*-CRFK at 8 dpi and 10 dpi. (A) Two VPs in the same  
581 host cell (thin arrow) containing parasites (thick arrow) in a typical rosette connected to the  
582 residual body by their posterior ends (arrowhead) at 8 dpi [Bar 2µm]; (B) At 10 dpi a well  
583 developed TMN was found anchoring the parasites (thick arrow) to the internal vacuolar  
584 membrane and also covering the parasites (arrowhead), thin arrows show the membrane of  
585 the host cell [Bar 1µm].

586

587

588 Figure 7: Cysts of *T. gondii* in CRFK at 13 dpi. (A) Intravacuolar structures of various  
589 sizes containing parasites with overlapping features like *T. gondii* cyst. [Bar 5µm]; (B) Cyst  
590 of *T. gondii* (C) near the host cell nuclei (HCN) containing parasites (P) with a large  
591 amount of amylopectin granules (Am) [Bar 1µm]; (C) Cyst of *T. gondii* presenting its  
592 electrondense cyst wall (CW) containing parasites showing a large number of amylopectin  
593 granules (Am) in CRFK with little cytoplasm [Bar 1µm].

593

594 Figure 8: Interaction of *T. gondii* in the ratio 1:20 (parasites/FIEC) at 6 dpi. (A) PV with  
595 several parasites (P) during the polyendodiogeny replication presenting a vacuolar matrix  
596 with tubulovesicular membrane network (TMN). Note the parasitophorous vacuole

597 containing parasites (P) associated to endoplasmatic reticulum (ER), mitochondria (Mi) and  
598 lipids droplets (Li); (B) Detail of parasitophorous vacuole membrane (PVM) closely related  
599 with ER and a well developed TMN; (C) PV presenting intravacuolar parasites with large  
600 lipid bodies (Li) and mitochondria (Mi) in asynchronous division, without typical rosette  
601 formations. The PV also presenting close association of ER and Mitochondrion (Mi) of the  
602 host cell (HC). [Bars 500nm]

603

604 Figure 9: Syncytial forms of *T. gondii* in CRFK. (A and B) Parasites (P) in  
605 parasitophorous vacuoles containing a highly developed tubulovesicular membrane  
606 network (TMN) at 7 dpi seen by TEM [Bar 500nm]; (C) PV presenting parasites with a  
607 large amount of amylopectin granules (Am), a round structure multinucleated with a large  
608 volume closely associated with the PVM, containing amylopectin granules (Am), lipid  
609 bodies (Li), more than one nucleus (N) and small vesicles that appear to spring from this  
610 structure in pellicular protrusions (arrowhead) [Bar 1µm]; (D) Many parasites in disarray  
611 and noticeably smaller than the standard sized parasites are seen among others in a  
612 typical rosette connected to the residual body (RB) [Bar 5µm].

613

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

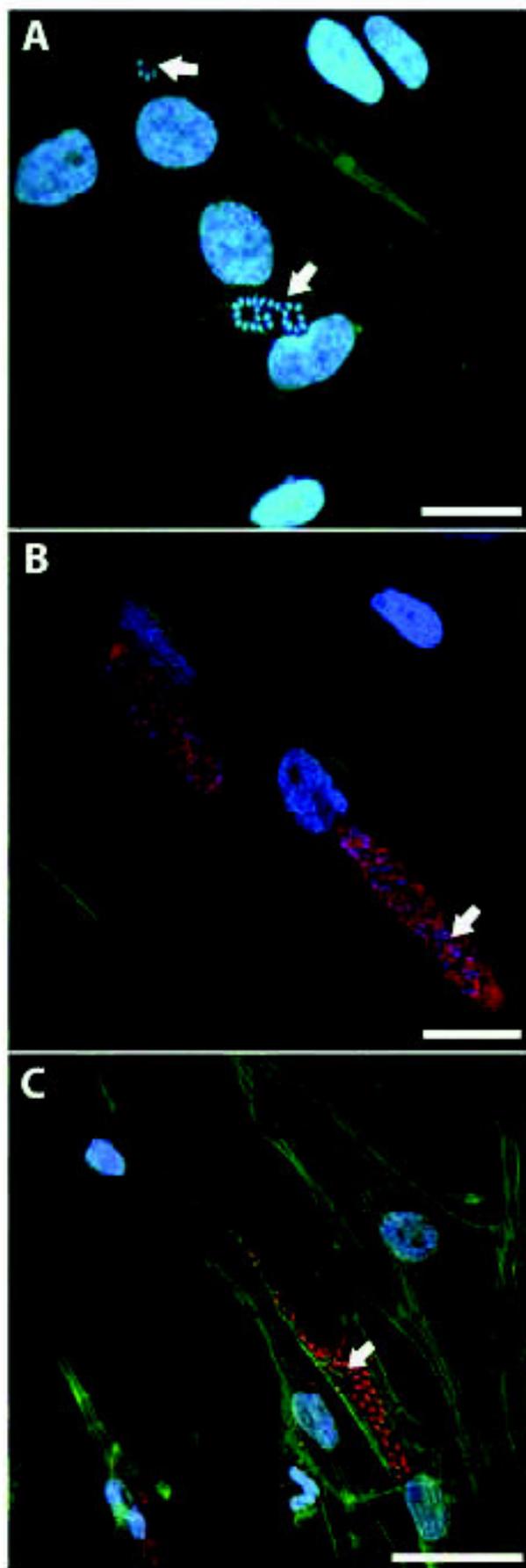


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

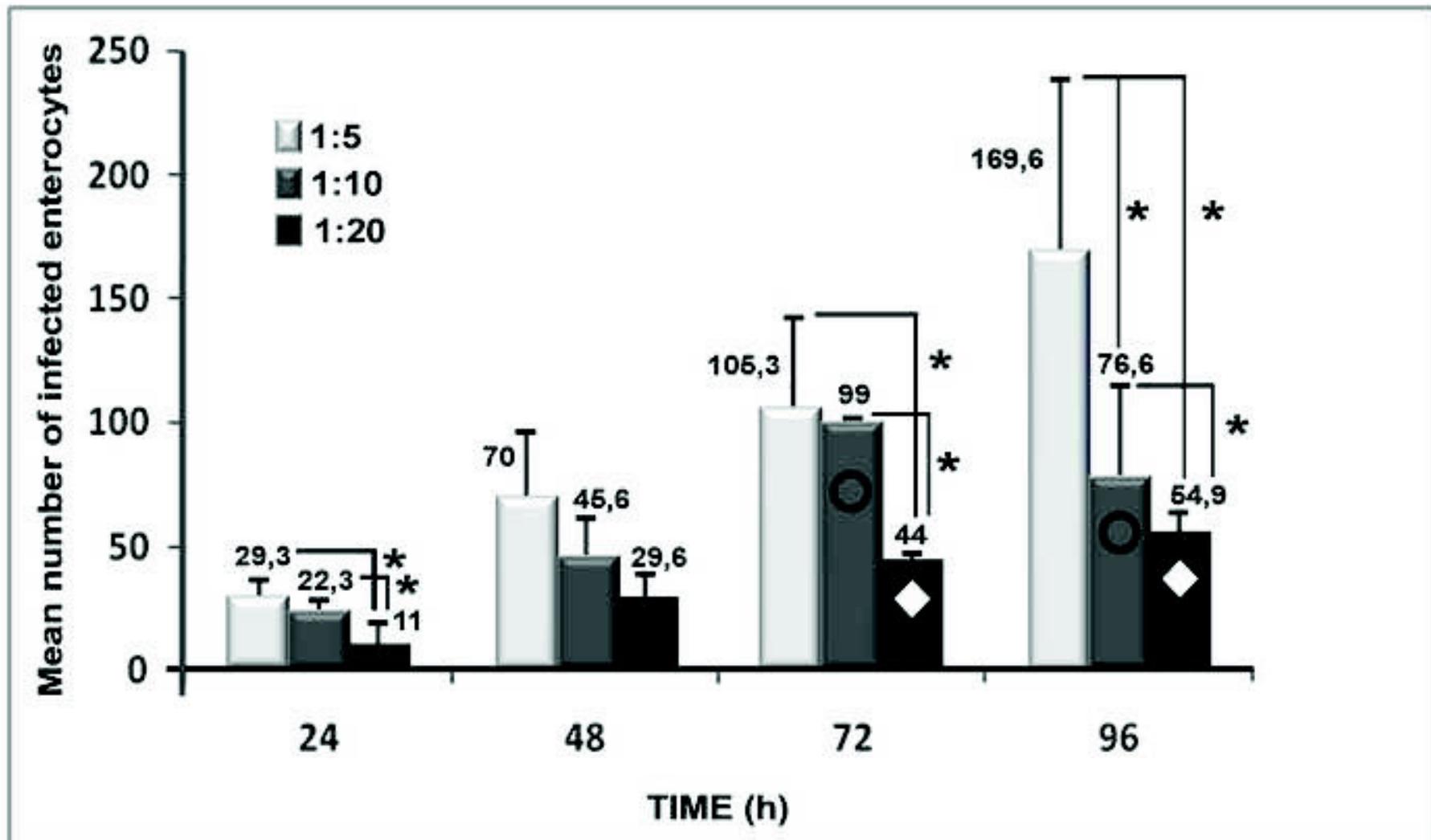


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

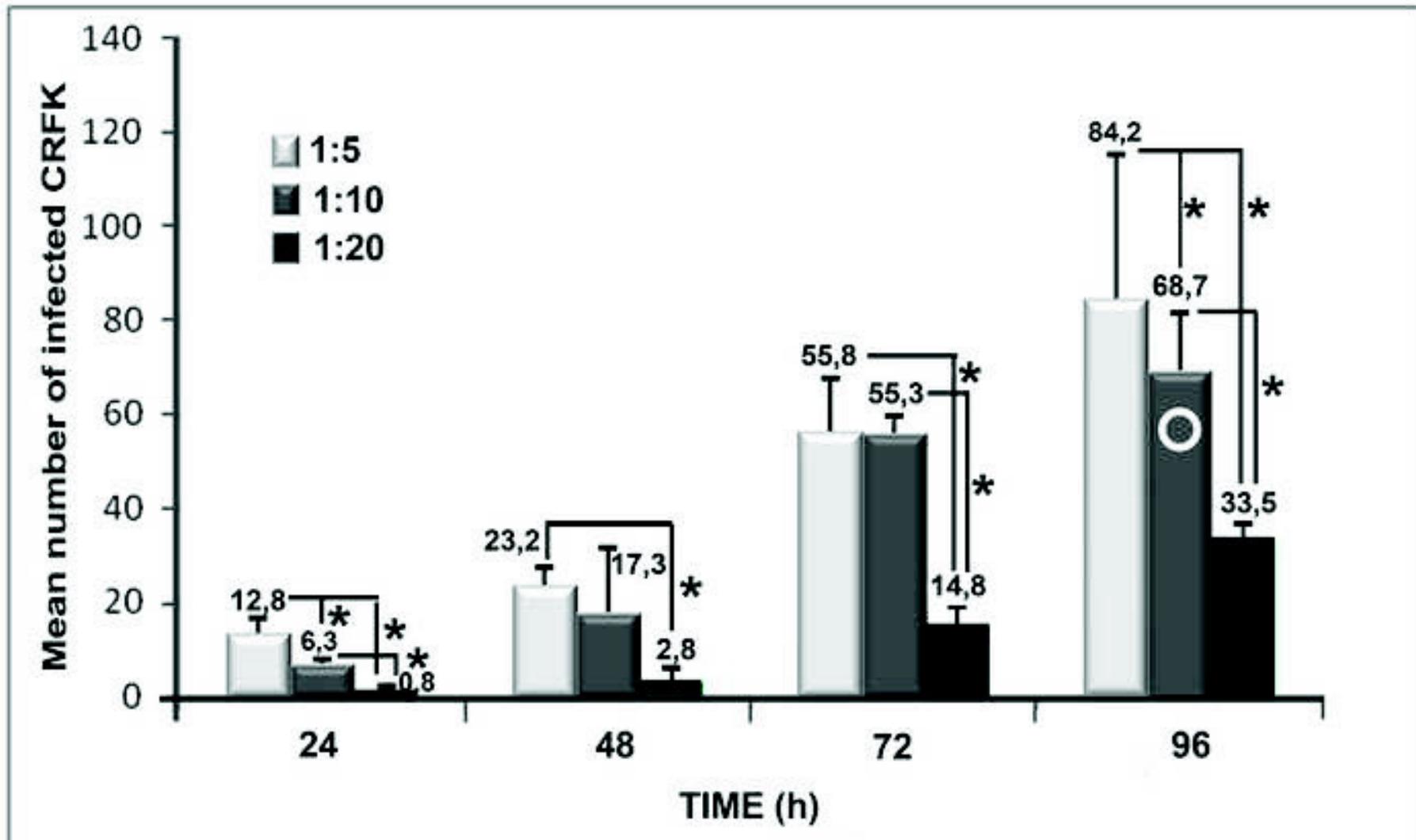


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

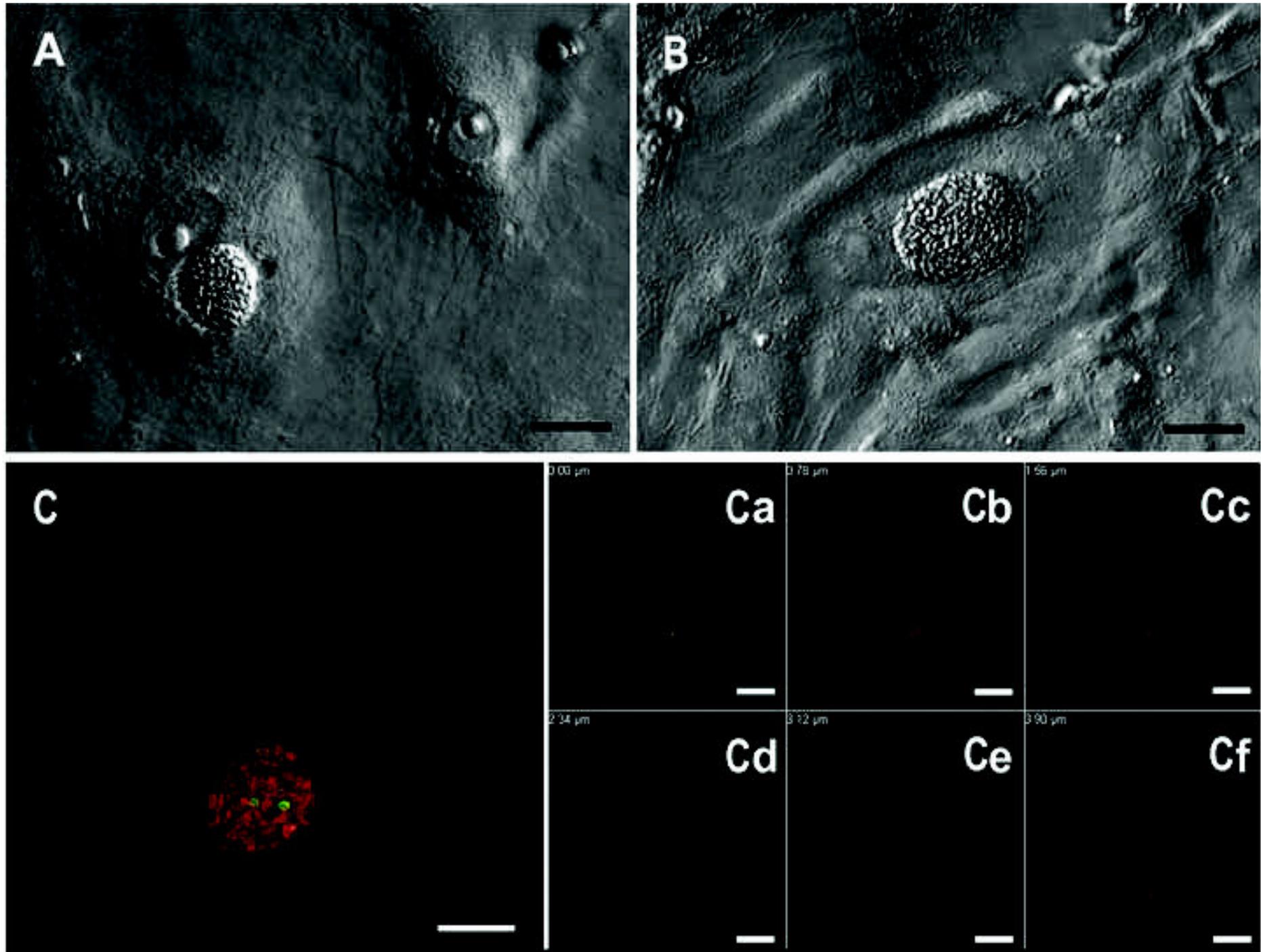


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

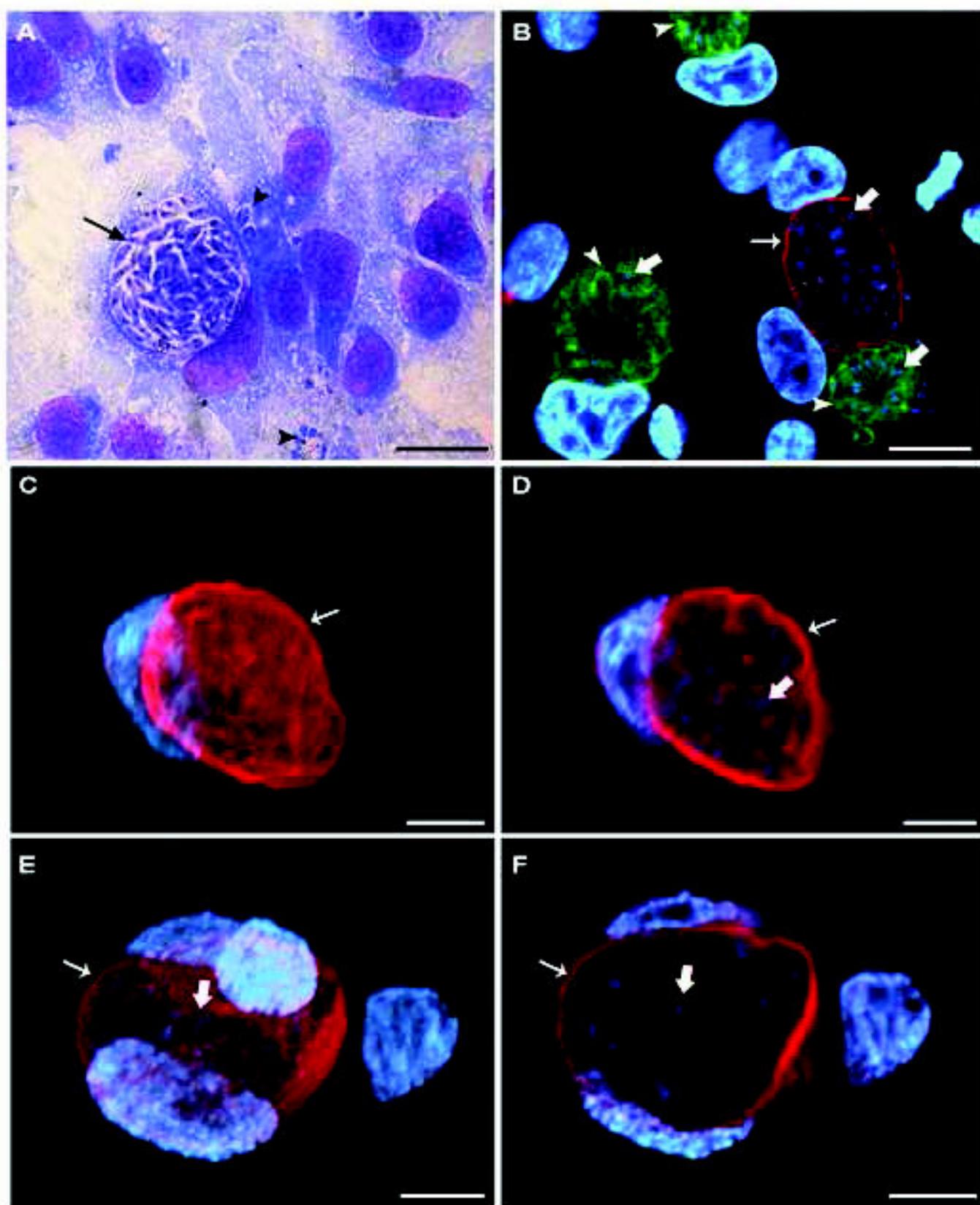


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)

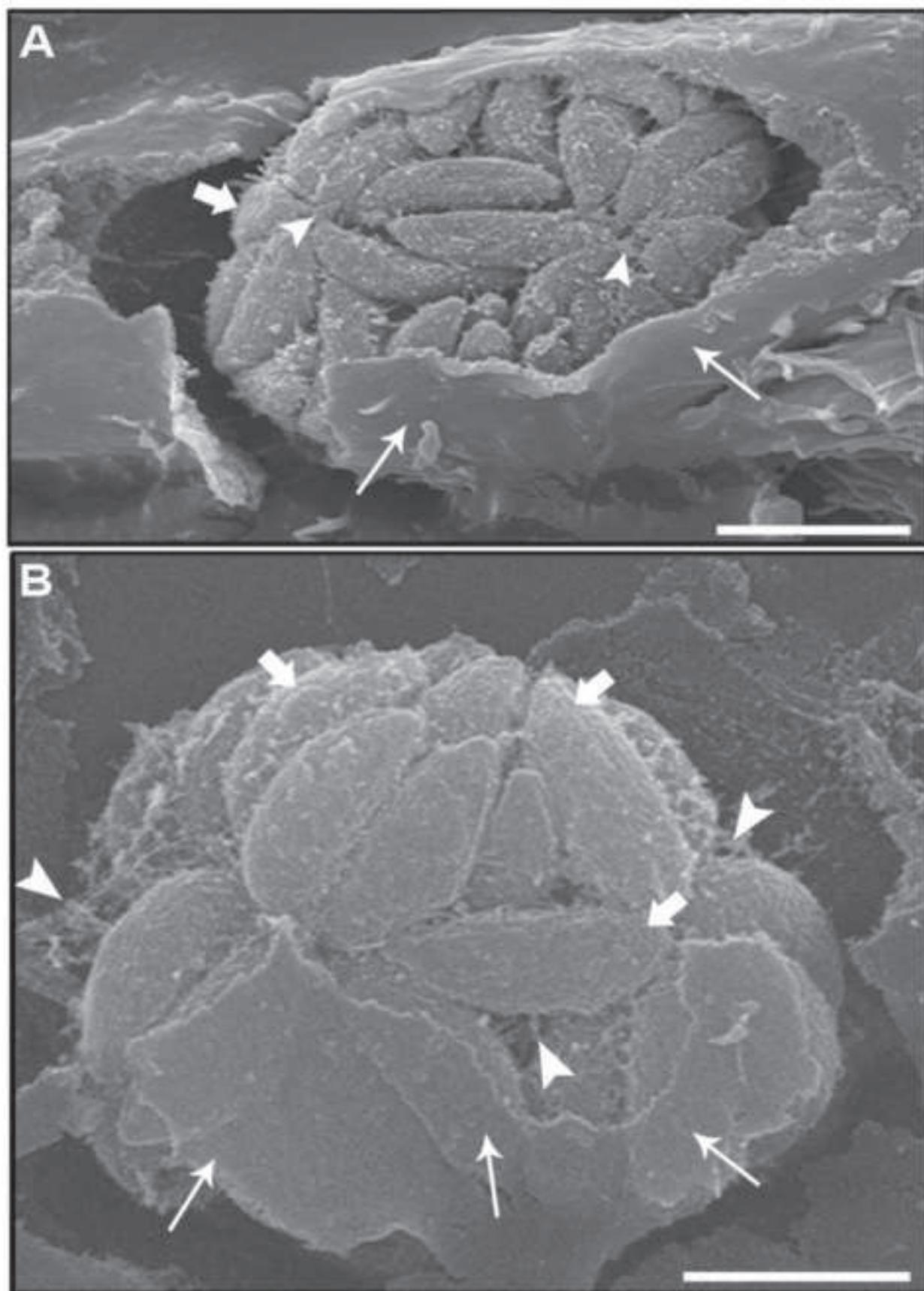


Figure 7  
[Click here to download high resolution image](#)

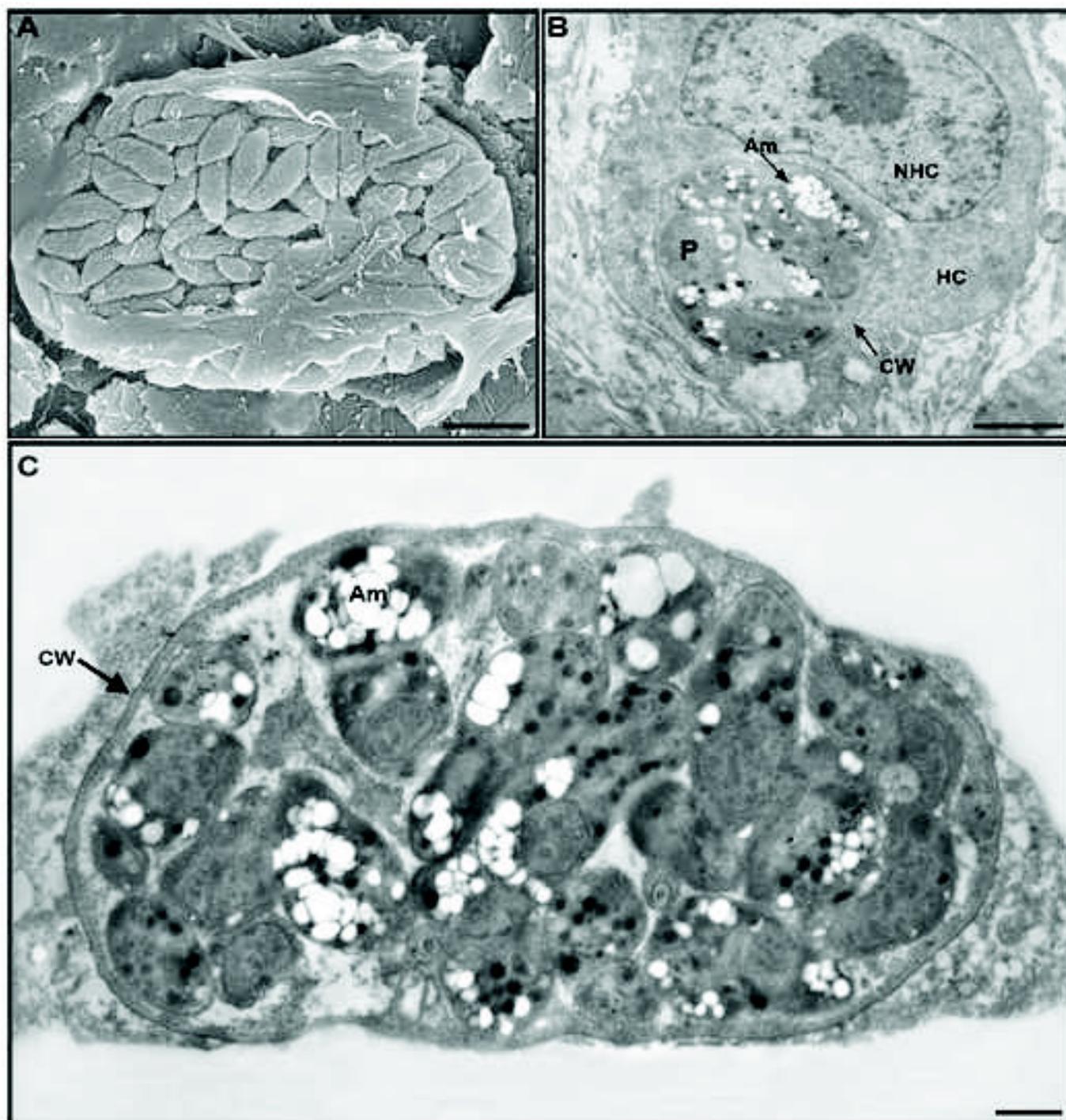


Figure 8  
[Click here to download high resolution image](#)

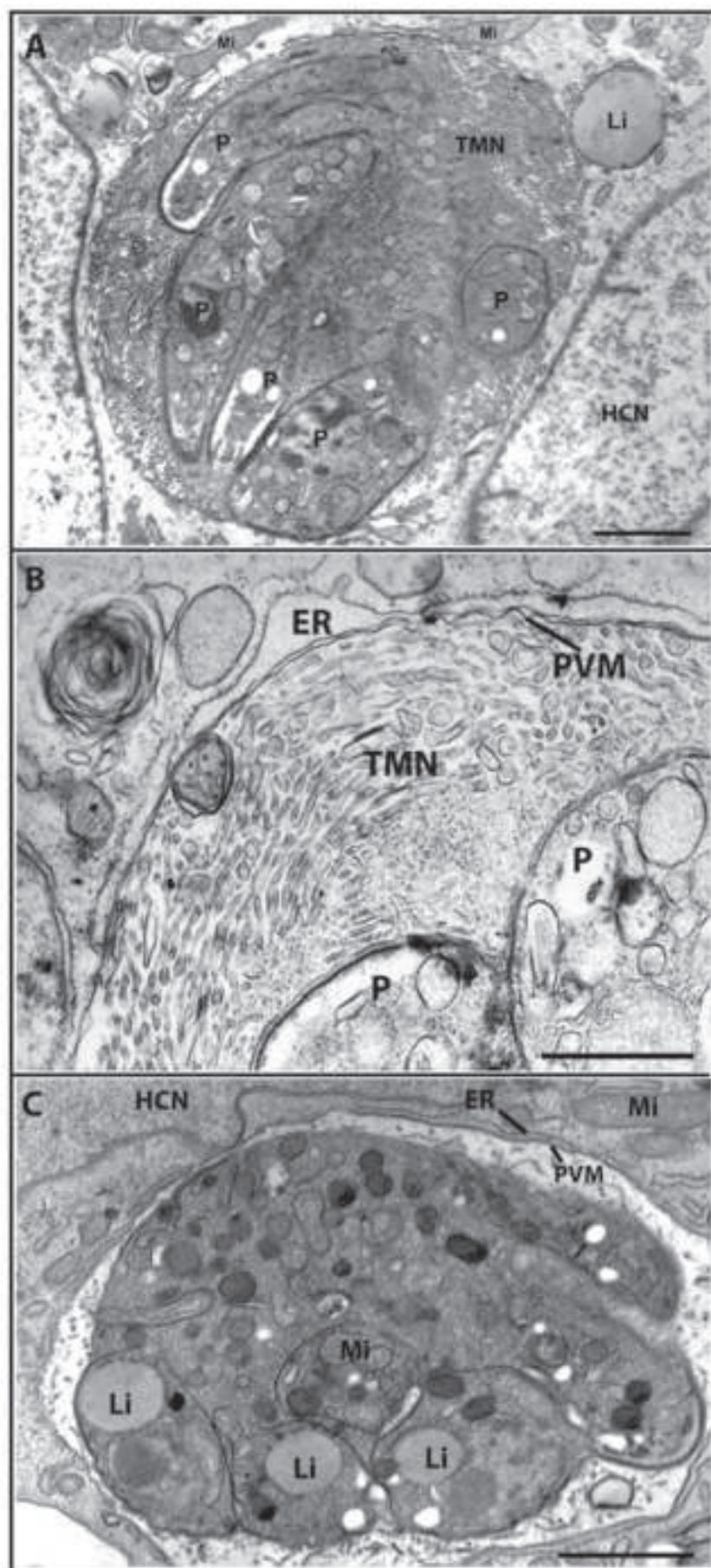


Figure 9  
[Click here to download high resolution image](#)

